



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA  
ÁREA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**Selección de levaduras y desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos  
para la mejora de los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid”**

Memoria presentada por:

**Margarita García García**

Para optar al grado de

**Doctor en Ciencias de la Alimentación**

Con mención de Doctorado Internacional

Directores de tesis:

**Dra. Teresa Arroyo Casado (IMIDRA)**

**Dr. Braulio Esteve Zarzoso (URV)**

Tutora académica:

**Dra. Laura Jaime de Pablo (UAM)**

**Madrid, 2018**

INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL, AGRARIO Y  
ALIMENTARIO

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN AGROALIMENTARIA





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA  
ÁREA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**Yeast selection and new biotechnological processes development for the  
improvement in wines from D.O. “Vinos de Madrid”**

Memoria presentada por:

**Margarita García García**

Para optar al grado de

**Doctor en Ciencias de la Alimentación**

Con mención de Doctorado Internacional

Directores de tesis:

**Dra. Teresa Arroyo Casado (IMIDRA)**

**Dr. Braulio Esteve Zarzoso (URV)**

Tutora académica:

**Dra. Laura Jaime de Pablo (UAM)**

**Madrid, 2018**

INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL, AGRARIO Y  
ALIMENTARIO

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN AGROALIMENTARIA





Dña. TERESA ARROYO CASADO, DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, INVESTIGADORA DEL DEPARTAMENTO DE AGROALIMENTACIÓN DEL INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL, AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDRA) Y D. BRAULIO ESTEVE ZARZOSO, DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA, INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD ROVIRA I VIRGILI.

CERTIFICAN: Que la memoria titulada - Selección de levaduras y desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos para la mejora de los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid”- que presenta Dña. Margarita García García para optar al grado de doctor en Ciencias de la Alimentación con mención de Doctorado Internacional, ha sido realizada en el laboratorio de Microbiología del IMIDRA, bajo nuestra supervisión.

Para dar cumplimiento a lo acordado por la Comisión de Doctorado de la Universidad Autónoma de Madrid firmamos el presente Certificado de Tesis en Madrid a 1 de Marzo de 2018.

Fdo.: Dra. Teresa Arroyo Casado

Fdo.: Dr. Braulio Esteve Zarzoso

*A mi abuelo*

## **AGRADECIMIENTOS**

Como no podía ser de otra manera empiezo estas líneas con una sonrisa, me hace mucha ilusión agradeceros toda vuestra ayuda, apoyo y paciencia...pero como esto es muy general, voy poco a poco.

Quiero agradecer a mis directores, la **Dra. Teresa Arroyo** y el **Dr. Braulio Esteve**, toda su confianza y dedicación. Teresa, muchas gracias, por ser tan generosa, tan cercana, por poner las cosas tan fáciles a las personas que te rodeamos y sobre todo por confiar en mí. Braulio, muchas gracias, por transmitirme tanta seguridad en todo momento y eso siempre me ha hecho verme capaz de hacer todo lo que se me ponía por delante, a pesar de la distancia, siempre has estado muy cerca. Como ya os he dicho muchas veces, creo que formamos un gran equipo. Gracias por enseñarme. Me considero afortunada de haberos tenido como directores.

Y como la tierra tira, de igual manera, me gustaría agradecer al **Dr. Juan Mariano Cabellos** por ser tan generoso, siempre dispuesto a enseñarte y guiarte en el complicado mundo de la Enología, o en cualquier mundo. Mariano, ha sido un placer tenerte cerca estos años.

A mis compañeros, muchas gracias siempre ha sido muy fácil ir a trabajar porque he estado siempre en familia. **Julia**, amiga, gracias por ser mi cómplice, siempre centrando mi atacamiento con "hay que apagar este fuego, amiga, luego ya vendrán otros", ¡un placer compartir contigo estos años y los que nos quedan! **Valery**, eres genuina, que buenos ratos me has hecho pasar, gracias por estar siempre ahí. **Ángel**, mil gracias por tu ayuda, que siempre me ha faltado fuerza y altura en la bodega, y ahí estabas tú, gracias por mimarnos tanto. **Miguel Ángel**, que habría hecho yo sin tu control informático y tu inventiva para crear todo lo que necesitábamos en el laboratorio o en la bodega, muchas gracias. **Andrés**, gracias amigo, por compartir charlas y darme tanto ánimo.

Bueno mi andadura en el IMIDRA empezó unos años antes y no me puedo olvidar de **Ana**, me alegro mucho de haberte encontrado y gracias por estar siempre cerca. **Juanjis**, mi compi de prácticas, que perdidos andábamos al principio, eres genial cargado de positividad siempre. Y sin olvidar, por supuesto, a **Tania, Gema, Pamela, Mariana y Alberto**, gracias por tantos buenos momentos.

Gracias al **IMIDRA**, por permitirme vivir esta experiencia y gracias a todos los compañeros que, de una forma u otra, han aportado su granito de arena a mi trabajo y bienestar. Gracias a todos **mis chicas y chicos de prácticas**, llenaría unas cuantas hojas con vuestros nombres, gracias por vuestra ayuda y porque explicando las cosas una siempre aprende. Gracias al **panel de cata**, que habéis tenido que sufrir o deleitar las mezclas de nuestras levaduras, esta tesis tiene buena parte vuestra. Gracias a las **compañeras del Laboratorio Enológico y el Laboratorio de Biología Molecular**, siempre ahí para ayudarme con los equipos o analizarnos nuestros vinos a toda prisa.

Gracias a la **Dra. Laura Jaime**, tutora académica de esta tesis, por su ayuda, disponibilidad y guía en todos los trámites con la universidad.

Me gustaría agradecer su generosidad a los responsables que me han permitido hacer las estancias y trabajar en sus grupos como una más. **Dr. Christian von Wallbrunn**, thank you for giving me the opportunity to be part of his team University of Geisenheim. Thanks to my “Geisenheimer” friends, **Roxana, Marta, Yakapan, Nee, Marcus, Iris, Jessica and Christopher**, for making me feel at home. Special thank you to **Dr. Thierry Doco** for trusting in our Project and for allowing me work and learn at INRA of Montpellier, thanks for teaching me so much about molecular structures. Thanks to **Pascale** for teaching me and have so good sense of humour. Gracias **Rafa**, por tu paciencia y organización con esos protocolos enormes para conseguir hacer tantas muestras en un tiempo récord, muchas gracias por toda tu ayuda. **Peggy**, gracias por tu ayuda y por el buen rollo que

transmites. **Ana, Belén y Elsa** un placer conoceos, compartir cafés escandalosos en el INRA, nos seguiremos viendo.

Gracias a TODOS mis amigos, siento mi retiro este tiempo, gracias por ayudarme a desconectar. **Vir**, por tu amistad, por conocerme tan bien y estar siempre a mi lado. **Helen**, por ser tan positiva, gracias por ayudarme a hacer este tiempo mucho más divertido. **Eva**, esto sí que ha sido caminar en paralelo, bueno amiga, ya queda poco y nuestras interminables charlas sobre secciones de tesis tienen su fin; **M<sup>a</sup> José**, que bonita eres, gracias por todo tu apoyo. **Gustavo**, menuda fusión más auténtica ha hecho el IMIDRA y Portilla, no sabes cuanto me alegro de haberte encontrado en el camino.

**Víctor**, muchísimas gracias por tu paciencia, por tomarte esta tesis como parte tuya y ayudarme en todo. Por hacerme la vida más fácil y siempre transmitirme que las cosas que hacen a uno feliz son pequeñas y sencillas. Has aguantado como un campeón que yo estuviera “recluida” frente al ordenador durante todo este tiempo, mil gracias.

Y, por último, gracias a mi familia. **Mis padres**, os debo haber llegado hasta aquí. Nunca habéis usado la palabra “no” para educarnos, siempre el “vamos”, “adelante”, “tú puedes”, con esa educación yo solo puedo sonreír a la vida. Gracias por todo vuestro sacrificio. A mi **hermano**, te adoro, gracias por cuidarme tanto, eres la generosidad en persona. Gracias por estar siempre a mi lado. A **mis primos**, José, Julia, Elena y Marta, por ser otros hermanos pequeños, sois geniales y piezas fundamentales en mi vida. Gracias a **mis tíos**. A mi **abuela**, eres única y la pieza clave de la familia, gracias por ese sentido del humor y querernos tanto.

Agradezco al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Agroalimentario por la concesión de la beca predoctoral FPI (BOE nº 223, 18/09/2012). De igual manera que agradezco a los organismos que han financiado mis estancias, en Alemania gracias a la organización COST (European Cooperation

in Science&Technology) bajo la acción COST FA1003; y en Francia, gracias a Erasmus+ por la concesión de una beca de movilidad Erasmus+ Prácticas. Gracias al Departamento de Bioquímica i Biotecnologia de la Universidad Rovira i Virgili por permitirme disponer de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

■	<b>PRESENTACIÓN/PRESENTATION .....</b>	<b>3</b>
■	<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
■	<b>1.PLANTEAMIENTO DE TESIS.....</b>	<b>15</b>
■	<b>2.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>27</b>
■	<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>109</b>
■	<b>4.DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>219</b>
■	<b>5.CONCLUSIONES GENERALES/GENERAL CONCLUSIONS.....</b>	<b>243</b>
■	<b>ANEXO I: ABREVIATURAS .....</b>	<b>249</b>
■	<b>ANEXO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>257</b>

**PRESENTACIÓN**

**PRESENTATION**





La presente memoria de Tesis Doctoral - Selección de levaduras y desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos para la mejora de los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid”- se presenta en forma de compendio de publicaciones científicas y cumple con los requisitos para la obtención de la mención de Doctor Internacional de acuerdo con la normativa de la Universidad Autónoma de Madrid, según los procedimientos aprobados por el Consejo de Gobierno el 15 de diciembre de 2011 y el 16 de julio de 2015.

El objetivo principal de esta Tesis es la selección de levaduras autóctonas de elevado potencial enológico y su utilización en el desarrollo de protocolos de elaboración de vinos de la Denominación de Origen “Vinos de Madrid”. Para ello, entre otros estudios, las levaduras han sido sometidas a diferentes condiciones de estrés fermentativo con el fin de seleccionar las cepas mejor adaptadas a la zona de producción de clima cálido y con aptitudes para soportar las condiciones derivadas del cambio climático en esta área de producción. Además, se han aplicado diferentes estrategias de inoculación con cepas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* a la elaboración de vino blanco de la variedad de uva autóctona Malvar.

Para facilitar la lectura de esta memoria, un primer apartado de “Planteamiento de tesis” centra la temática de la Tesis y describe sus objetivos. Seguidamente, la “Introducción” muestra los trabajos más relevantes relacionados con el tema de estudio y amplía la información sobre los diferentes conceptos tratados. En el capítulo de “Resultados y discusión” se recogen las cinco publicaciones científicas resultantes de los diferentes estudios realizados durante la elaboración de esta Tesis, donde también se aporta un resumen de cada artículo y la contribución original del autor. Posteriormente, se realiza una “Discusión general” de los resultados obtenidos y, por último, se incluye el capítulo de las “Conclusiones” más destacadas que pueden extraerse de esta Tesis. Finalmente, como Anexo I y Anexo II, se incluye las “Abreviaturas” encontradas en el texto y una sección de “Materiales y métodos” donde se describe la metodología desarrollada para llevar a cabo los objetivos planteados inicialmente.

Las publicaciones científicas incluidas en esta memoria son:

- 1- García, M., Esteve-Zarzoso, B. y Arroyo, T. (2016) ‘Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production’, in Morata, A., Loira, I. (ed.) Grape and Wine Biotechnology. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 249–272. doi: 10.5772/64957.

- 2- García, M., Greetham, D., Wimalasena, T. T., Phister, T. G., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. (2016) 'The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates', *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), pp. 215–233. doi: 10.1111/jam.13139.
- 3- García, M., Arroyo, T., Crespo, J., Cabellos, J. M. y Esteve-Zarzoso, B. (2017) 'Use of native non-*Saccharomyces* strain: A new strategy in D.O. "Vinos de Madrid" (Spain) wines elaboration', *European Journal of Food Science and Technology*, 5(2), pp. 1–31.
- 4- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. (2017) 'Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential Fermentations Made by Native Strains from D.O. "Vinos de Madrid" Using Real-Time Quantitative PCR', *Frontiers in Microbiology*, 8:2520. doi: 10.3389/fmicb.2017.02520.
- 5- García, M., Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., Crespo, J. y Doco, T. (2017) 'Polysaccharides and Oligosaccharides Produced on Malvar Wines Elaborated with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 and *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 Native Yeasts from D.O. "Vinos de Madrid", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, pp. 6656–6664. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01676.

The present Doctoral Thesis - Yeast selection and new biotechnological processes development for the improvement in wines from D.O. “Vinos de Madrid”- is presented as a compilation of scientific papers and it meets the requirements for the application of the International Doctor mention according to the Universidad Autónoma de Madrid legislation, which was approved under the procedures established by the Governing Board on the fifteenth of December, 2011 and the sixteenth of July, 2015.

The main objective of this Thesis was the selection of native yeasts with high enological potential and their use in the development of winemaking protocols in the Denomination of Origin “Vinos de Madrid”. For this purpose, among other studies, the yeasts have been exposed to different fermentative stresses in order to select the best adapted strains to the production area with warm climate and ability to support the conditions resulting from the climatic change in this production area. Furthermore, different inoculation strategies with *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast strains have been applied to white wine elaboration with the native grape variety Malvar.

The Doctoral Thesis begins with a chapter “Thesis approach” that explains the subject and describes the objectives. Then, the “Introduction” shows the most relevant studies related to the subject of this Thesis and provides information about the different concepts featured. The five scientific publications are included in “Results and discussion” chapter, which also contains a summary of each scientific paper and the original contribution of the author. Then, a “General discussion” of obtained results is included, and the last chapter of “Conclusions” presents the most important findings which can be drawn from this Thesis. Finally, as Annex I and Annex II, it is included the “Abbreviations” used in the text and a section of “Materials and methods” where it is described the methodology developed in order to carry out the initially proposed objectives.

The scientific publications included on this Thesis are:

- 1- García, M., Esteve-Zarzoso, B. and Arroyo, T. (2016) ‘Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production’, in Morata, A., Loira, I. (ed.) Grape and wine biotechnology. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 249–272. doi: 10.5772/64957.

- 2- García, M., Greetham, D., Wimalasena, T. T., Phister, T. G., Cabellos, J. M. and Arroyo, T. (2016) 'The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates', *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), pp. 215–233. doi: 10.1111/jam.13139.
- 3- García, M., Arroyo, T., Crespo, J., Cabellos, J. M. and Esteve-Zarzoso, B. (2017) 'Use of native non-*Saccharomyces* strain: A new strategy in D.O. "Vinos de Madrid" (Spain) wines elaboration', *European Journal of Food Science and Technology*, 5(2), pp. 1–31.
- 4- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J. M. and Arroyo, T. (2017) 'Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential Fermentations Made by Native Strains from D.O. "Vinos de Madrid" Using Real-Time Quantitative PCR', *Frontiers in Microbiology*, 8:2520. doi: 10.3389/fmicb.2017.02520.
- 5- García, M., Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., Crespo, J. and Doco, T. (2017) 'Polysaccharides and Oligosaccharides Produced on Malvar Wines Elaborated with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 and *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 Native Yeasts from D.O. "Vinos de Madrid", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, pp. 6656–6664. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01676.

**RESUMEN**

**ABSTRACT**





Tradicionalmente, *Saccharomyces cerevisiae* se ha considerado el principal microorganismo en el proceso de fermentación y se emplea de manera cotidiana en enología. Con la inoculación de cultivos iniciadores apropiada y la adición de dióxido de azufre al mosto, los enólogos consiguen eliminar o minimizar la influencia de otras levaduras diferentes a la cepa de *S. cerevisiae* seleccionada. Mediante esta metodología, se ha alcanzado un control óptimo del proceso, aunque los vinos producidos podrían carecer de complejidad sensorial y ser demasiado similares entre sí cuando proceden de variedades de vid poco aromáticas. En los últimos años, las especies de levaduras no-*Saccharomyces* han sido propuestas para la elaboración de vinos, y su aplicación supone un cambio en la elaboración orientada a la mejora de la calidad y diversificación del producto final. De forma análoga, el uso de levaduras autóctonas también se está viendo potenciado. Las levaduras nativas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* son aisladas de diferentes regiones vitivinícolas lo que les hace representativas de una región concreta, además de estar mejor adaptadas a las condiciones ambientales específicas y al sustrato.

El planteamiento de esta Tesis se fundamenta siguiendo esta nueva tendencia, el empleo de levaduras propias de la zona de origen y en el uso de cepas no-*Saccharomyces* para su aplicación a la elaboración de vinos tradicionales con la variedad de uva regional Malvar en la D.O. “Vinos de Madrid”. Para ello, cepas de *S. cerevisiae* aisladas de viñedos y bodegas de la D.O. “Vinos de Madrid” y cepas de no-*Saccharomyces* seleccionadas debido a su potencial biotecnológico, fueron ensayadas bajo diferentes condiciones de estrés (presión osmótica, etanol y pH) inherentes a la fermentación en zonas de producción de clima cálido. Por otra parte, se aplicaron diferentes técnicas de inoculación (cultivo puro, mixto y secuencial) con cepas autóctonas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* con el fin de seleccionar las mejores combinaciones para potenciar y mejorar las propiedades de los vinos de la variedad de uva blanca Malvar de esta D.O. En una primera aproximación los ensayos se realizaron a escala de laboratorio, y las mejores cepas y posibles combinaciones de las mismas fueron ensayadas a escala piloto en la bodega experimental del IMIDRA, lo que permitió hacer un seguimiento de las especies de levaduras estudiadas por técnicas independientes de cultivo. Al mismo tiempo, se analizó el contenido de polisacáridos y oligosacáridos, así como las características organolépticas y sensoriales de todos los vinos elaborados.

Los resultados muestran la existencia de cepas de levaduras autóctonas bien adaptadas a las condiciones climáticas de su área de producción, presentando óptimas capacidades fermentativas, por lo que pueden ser consideradas como una herramienta aplicable a mitigar los efectos del cambio climático en la producción actual de vino en zonas de climas cálidos. Además, se han seleccionado estrategias de inoculación eficaces entre levaduras *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* con el fin de promover diferentes propiedades enológicas, aromáticas y sensoriales en los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid” atendiendo a las necesidades de los productores y al mercado vitivinícola actual. Adicionalmente, también se proporciona importante y novedosa información sobre el contenido y tipo de polisacáridos y oligosacáridos presentes en el vino procedentes de la pared celular de las uvas y de las levaduras durante la fermentación, estando su liberación influenciada notablemente por la estrategia de inoculación y la especie de levadura empleada en el proceso fermentativo.



Traditionally, *Saccharomyces cerevisiae* has been considered the primary microorganism in the fermentation process and it is daily used in oenology. By appropriate inoculation of starter cultures and addition of sulphur dioxide to the must, winemakers aimed to eliminate or minimize the influence of yeasts different to the strain *S. cerevisiae* selected. By this methodology, a good control of the process has been achieved, although the wines produced may be lacking in flavor complexity and are too standardized when coming from not much aromatic grape varieties. In recent years, non-*Saccharomyces* yeasts species have been proposed for winemaking and their application has changed the standardized way to produce wine to improve the quality and diversification of the final product. Similarly, the use of native yeasts is also being enhanced. The native *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains are isolated from different winegrowing regions, which makes them be representative of a certain region in addition to being better adapted to specific environmental conditions and to the substrate.

The approach of this Thesis is based on this new trend, the use of yeasts from defined origin area and the use of non-*Saccharomyces* strains for their application in traditional wines elaboration with the regional grape variety Malvar from D.O. “Vinos de Madrid”. For this purpose, *S. cerevisiae* strains isolated from vineyards and cellars in D.O. “Vinos de Madrid” and non-*Saccharomyces* strains selected based on their biotechnological potential, have been tested under different stress conditions (osmotic pressure, ethanol and pH) inherent to wine fermentation in warm climates. Moreover, different inoculation strategies (pure, mixed and sequential cultures) with native *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* were made to choose the best combination to increase and improve the Malvar wines properties from this D.O. In a first approximation, the trials were realized at laboratory scale, and the best strains and possible combinations thereof were tested at pilot scale in the IMIDRA experimental cellar, which allowed the monitoring of yeast species by culture-independent techniques. At the same time, the polysaccharides and oligosaccharides content were analyzed, as well as the organoleptic and sensorial characteristics in all wines elaborated.

The results show the existence of native strains well adapted to the climatic conditions in each area of production, with good fermentative abilities, so, they can be considered as a tool to mitigate the climate change effects on the actual wine

production in warm areas. Furthermore, suitable inoculation strategies have been selected between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* to promote different enological, aromatic and sensorial properties in wines from D.O. “Vinos de Madrid” depending on the winemakers’ requirements and the current wine market. Additionally, novel and important information has also been provided about the content and structure of polysaccharides and oligosaccharides from grapes or yeasts cell walls during the fermentation process, whose release is significantly influenced by the type of inoculation and the yeast species used in the fermentation process.

## 1. PLANTEAMIENTO DE TESIS



<b>1.1. Objetivos/Objectives .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2. Interés del tema .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Plan de trabajo .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4. Bibliografía .....</b>	<b>23</b>

### 1.1. Objetivos

El trabajo de tesis que se presenta tiene como objetivo principal la selección de levaduras autóctonas de elevado potencial enológico y su utilización en el desarrollo de protocolos de elaboración de vinos en la Denominación de Origen “Vinos de Madrid”. Para llevar a cabo el estudio se plantean los siguientes objetivos parciales:

- 1- Estudio bibliográfico sobre las características enológicas interesantes de las levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* para su aplicación en fermentaciones de vino y estudio de las condiciones de adaptación de las levaduras a situaciones de estrés fermentativo; así como de las estrategias de inoculación con cultivos mixtos.
- 2- Caracterización enológica bajo condiciones de estrés fermentativo de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de viñedos y bodegas de la D.O. “Vinos de Madrid”, y cepas de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en base a su potencial biotecnológico.
- 3- Diseño de diferentes estrategias de inoculación empleando levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*, estudiando su comportamiento en microvinificaciones con objeto de determinar las mejores combinaciones y metodologías a aplicar en la elaboración de vino blanco de la variedad Malvar.
- 4- Estudio mediante PCR cuantitativa en tiempo real de la evolución de las poblaciones de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, inoculadas con las diferentes metodologías, ensayadas a mayor escala fermentativa con la variedad Malvar.
- 5- Estudio de la contribución de las diferentes estrategias de inoculación en el contenido de polisacáridos y oligosacáridos en los vinos elaborados con la variedad autóctona Malvar, utilizando las levaduras seleccionadas.

### 1.1. Objectives

The presented Doctoral Thesis has as main objective the selection of native yeasts with high enological potential and their use in the development of winemaking protocols in the Denomination of Origin “Vinos de Madrid”. The following partial objectives were proposed to carry out the study:

- 1- Bibliographic review about the interesting enological characteristics of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts for their implementation in wine fermentations and study of yeasts adaptation conditions under fermentative stress situations; as well as the inoculation strategies with mixed cultures.
- 2- Enological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains, isolated from vineyards and cellars of the D.O. “Vinos de Madrid”, and non-*Saccharomyces* yeast strains selected according to their biotechnological potential, under fermentative stress conditions.
- 3- Design of different inoculation strategies with non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* yeasts, studying their behaviour in microvinifications to determine the best combinations and methodologies applied to Malvar white wine elaboration.
- 4- Study by real-time quantitative PCR of the *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations evolution, inoculated under different elaboration methodologies at higher scale with Malvar grape variety.
- 5- Study of different inoculation strategies contribution to the content of polysaccharides and oligosaccharides in wines elaborated with the autochthonous grape variety Malvar, using the selected yeasts.

## 1.2. Interés del tema

La mejora en la elaboración del vino y la búsqueda de productos novedosos que mantengan el equilibrio entre las nuevas tecnologías, la calidad y revele su procedencia, es un tema actual de investigación.

En un intento de aplicar nuevas estrategias, aunar las demandas de los consumidores y elaborar productos con mayor personalidad y relevancia tanto en el mercado nacional como en el internacional, se plantea el estudio, basado en la búsqueda, caracterización y selección de cepas de levaduras autóctonas para que aplicadas como herramienta biotecnológica, contribuir a potenciar la diversidad y tipicidad de los vinos en las diferentes zonas de producción de la Denominación de Origen (D.O.) “Vinos de Madrid”.

La política de mejora de los productos elaborados en la D.O. “Vinos de Madrid” se caracteriza por considerar la investigación como fundamento de la continua innovación de la producción vinica. En este sentido, se está llevando a cabo un intenso esfuerzo de modernización e investigación del sector enológico que incluye trabajos sobre el uso de variedades de vid autóctonas y minoritarias para vinificación, caracterización de los vinos y mejora de sus propiedades, así como aplicación de crianzas oxidativas en barrica para el envejecimiento del vino. Sin embargo, aunque se han llevado a cabo estudios microbiológicos en vinos de la D.O. de Madrid, hasta este momento no se había analizado en profundidad la microbiota autóctona con miras a su selección y aplicación biotecnológica a la mejora de los vinos.

De manera general, el empleo de levaduras comerciales está muy extendido entre las prácticas enológicas seguidas por los elaboradores para garantizar sus producciones, homogeneizar las calidades y aportar en algunos casos características específicas a los vinos. Pero a consecuencia de esta actividad continuada, se viene observando en los últimos años, que un empleo masivo de levaduras comerciales tiende a la pérdida de biodiversidad, y a una homogeneización de las características de los vinos elaborados en las diferentes zonas de producción (Rainieri y Pretorius 2000; Cappello et al. 2004). De manera adicional, el empleo de levaduras comerciales no siempre cumple el objetivo buscado debido a la existencia de competencia con otras levaduras presentes en las bodegas (Beltran et al. 2002), lo que puede originar posibles pérdidas económicas para el sector ante la dificultad en el control y garantía del éxito en las fermentaciones dirigidas.

Por esta razón, la selección y el empleo de microorganismos, obtenidos de la microbiota autóctona, supondría un potente instrumento para optimizar las características organolépticas y sensoriales de un producto (Rodríguez et al. 2010). Se considera que las levaduras autóctonas están mejor adaptadas a un tipo de mosto específico, que mantiene las características determinadas de la variedad de uvas y el *terroir*, y, por tanto, son más aptas para exaltar las peculiaridades (aroma, estructura y color) del vino resultante (Lopes et al. 2007). También, estas levaduras autóctonas pueden desarrollar respuestas a factores de estrés ambientales que inciden en su viabilidad y metabolismo. En este sentido, el cambio climático que afecta a la fenología de la vid y a la composición de la uva, se refleja también en las vinificaciones, y, por tanto, afecta a la microbiología del vino, a la química y a los aspectos sensoriales de éste (Bernetti et al. 2012; Palliotti et al. 2014). Por lo que, en la búsqueda y empleo de levaduras adaptadas a las condiciones climáticas de su región de origen se tienen en cuenta aspectos de adaptación y resistencia a condiciones de estrés, en un intento de mitigar el problema producido en la química de la uva por el cambio climático.

En general, cuando se estudian las levaduras vnicas, *Saccharomyces cerevisiae* se considera la especie por excelencia en la transformación de los azúcares del mosto, y ha sido pionera en los procesos de selección y producción de cultivos iniciadores (Fleet y Heard 1993; Swiegers et al. 2005). Sin embargo, durante las primeras etapas de la fermentación están presentes otro grupo de levaduras, no-*Saccharomyces*, consideradas tradicionalmente como levaduras de alteración. Por el contrario, estudios más recientes indican que bajo determinadas condiciones, pueden aportar características favorables a la composición final del vino (Ciani y Maccarelli 1998; Cray et al. 2013). Por este motivo, las nuevas tendencias en enología pugnan por el uso combinado de ambos grupos de levaduras (Rojas et al. 2003; Ciani et al. 2006; Jolly et al. 2006). El uso de cultivos mixtos de levaduras, ofrece una práctica alternativa para intensificar y mejorar las propiedades sensoriales de los vinos (Esteve-Zarzoso et al. 1998; Howell et al. 2006; Fleet 2008; Benito et al. 2012; Cordero-Bueso et al. 2013; Contreras et al. 2014; Renault et al. 2015; Whitener et al. 2017). En general, las levaduras no-*Saccharomyces* contribuyen a la calidad del vino, pero no siempre son capaces de completar la fermentación debido a su baja tolerancia al alcohol. Por otra parte, se ha demostrado que estas levaduras pueden presentar actividades enzimáticas o producir metabolitos deseables capaces de modificar las características sensoriales del vino (Rojas et al. 2001; Ciani et al. 2010). En este contexto, la utilización



de cultivos mixtos de cepas no-*Saccharomyces* y cepas *Saccharomyces* constituye una herramienta muy útil que permitirá aprovechar las ventajas de una fermentación espontánea evitando problemas de ralentización y/o paradas fermentativas, a la vez que favorecerá la complejidad organoléptica y, por tanto, la calidad del vino obtenido (Romano et al. 2003; Ciani et al. 2010).

En base a todo lo anterior, y como iniciativa a un mayor conocimiento de la microbiota asociada a los viñedos y bodegas, y a la caracterización y selección de las cepas de interés para su utilización en procesos industriales, surge el presente proyecto de tesis en el que se aborda el estudio y selección de cepas de levaduras autóctonas para la mejora de la calidad de los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid”.

### 1.3. Plan de trabajo

El trabajo de investigación que se plantea se fundamenta en la importante colección de levaduras existente en el IMIDRA (CLI), colección que se inició en 1950 y que, en la actualidad, consta de aproximadamente 1.200 aislados de *S. cerevisiae* agrupadas en 400 genotipos diferentes aplicando la técnica de identificación por microsatélites propuesta por Vaudano y García-Moruno (2008), y alrededor de 2.000 aislados de levaduras no-*Saccharomyces* repartidas en 12 especies procedentes de ensayos agronómicos en el cultivo ecológico y tradicional de la vid en la D.O. “Vinos de Madrid” y de fermentaciones espontáneas de mosto de la variedad Malvar (Cordero-Bueso et al. 2011; 2013).

En estudios previos a la realización de esta tesis, se aislaron levaduras procedentes de viñedos y bodegas de las tres subzonas de la D.O. “Vinos de Madrid”, Arganda, Navalcarnero y San Martín de Valdeiglesias con el fin de profundizar en la ecología microbiana de la zona y contribuir a la recuperación de la microbiota autóctona, así como delimitar su distribución en viñedos y bodegas, llegando a identificar en este estudio alrededor de 100 genotipos de *S. cerevisiae* (Tello et al. 2012). Por otra parte, el potencial biotecnológico de las diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces* fue estudiado en fermentaciones realizadas con mosto de la variedad Malvar (Cordero-Bueso et al. 2013). Estos estudios sirvieron de punto de partida para la elaboración de la tesis.

Para comenzar, la primera actuación en la selección de levaduras autóctonas a realizar en esta tesis fue la selección de levaduras resistentes a diferentes tipos de estrés fermentativo (presión osmótica, pH y etanol), así fueron ensayados 94 genotipos de

levaduras *S. cerevisiae* procedentes de viñedos y bodegas de la D.O. y, 29 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* de la colección del IMIDRA. Las cepas con mejores características se seleccionaron para posteriores estudios.

De este modo, cepas de levaduras no-*Saccharomyces* que se mostraron más resistentes a condiciones de estrés y/o producían enzimas de interés enológico, fueron seleccionadas para la elaboración de nuevos protocolos de inoculación en fermentaciones junto a la cepa de referencia *S. cerevisiae* CLI 889 (CECT 13145), seleccionada por Arroyo (2000) en base a criterios enológicos. La mayoría de las levaduras no-convencionales son incapaces de completar la fermentación alcohólica y, de modo general requieren la contribución de *S. cerevisiae* para asegurar la completa fermentación de los azúcares del mosto. Las diferentes levaduras pueden ser añadidas simultáneamente como coinóculo (Soden et al. 2000; Jolly et al. 2003; Wang et al. 2014; Renault et al. 2015) o de manera secuencial, siendo la incorporación de *S. cerevisiae* a la fermentación posterior a la cepa no-*Saccharomyces* (Zironi et al. 1993; Ferraro et al. 2000; Benito et al. 2015). Entre las estrategias de inoculación ensayadas se eligieron las mejores combinaciones de las cepas seleccionadas para ser ensayadas a mayor escala de vinificación en la bodega experimental del IMIDRA.

Para comprobar la evolución de las levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* inoculadas, se llevaron a cabo estudios de monitorización a lo largo de la fermentación mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, sobre las fermentaciones mixtas y secuenciales ensayadas en bodega.

Por otra parte, en cuanto al estudio de la producción de metabolitos de interés durante la fermentación alcohólica realizada con levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, se hicieron análisis de compuestos aromáticos así como del contenido de polisacáridos y oligosacáridos liberados en el vino, ya que hay un interés creciente en su estudio pues se relacionan con propiedades tecnológicas y sensoriales presentes en los vinos (Caridi 2006; Chalier et al. 2007; Quijada-Morín et al. 2014; Babbar et al. 2016).

Para completar el estudio de la eficacia de las levaduras y de las diferentes condiciones ensayadas, los vinos elaborados en este trabajo fueron sometidos a un examen organoléptico por parte de un panel de cata integrado por catadores entrenados en el análisis de vinos blancos de la variedad autóctona Malvar.

## 1.4. Bibliografía

Arroyo, T. (2000) *Estudio de la influencia de diferentes tratamientos enológicos en la evolución de la microbiota y en la calidad de los vinos elaborados con la variedad Airén, en la D.O. 'Vinos de Madrid'* (tesis doctoral). Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá.

Babbar, N., Dejonghe, W., Gatti, M., Sforza, S. y Elst, K. (2016) 'Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: Production, characterization and health benefits', *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), pp. 594–606.

Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N. y Mas, A. (2002) 'Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study', *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), pp. 287–293.

Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J. y Rauhut, D. (2015) 'Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*', *European Food Research and Technology*, 241(5), pp. 707–717.

Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F. y Suárez-Lepe, J. A. (2012) 'New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines', *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), pp. 2101–2108.

Bernetti, I., Menghini, S., Marinelli, N., Sacchelli, S. y Sottini, V. A. (2012) 'Assessment of climate change impact on viticulture: Economic evaluations and adaptation strategies analysis for the Tuscan wine sector', *Wine Economics and Policy*, 1(1), pp. 73–86.

Cappello, M. S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. y Zacheo, G. (2004) 'Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard', *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), pp. 1274–1280.

Caridi, A. (2006) 'Enological functions of parietal yeast mannoproteins', *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(3–4), pp. 417–422.

Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T. y Gunata, Z. (2007) 'Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains', *Food Chemistry*, 100(1), pp. 22–30.

Ciani, M., Beco, L. y Comitini, F. (2006) 'Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations', *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), pp. 239–245.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. y Domizio, P. (2010) 'Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking', *FEMS Yeast Research*, 10(2), pp. 123–133.

Ciani, M. y Maccarelli, F. (1998) 'Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), pp. 199–203.

Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C. y Varela, C. (2014) 'Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), pp. 1670–1678.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D. y Valero, E. (2011) 'Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries', *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), pp. 132–139.

Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M. y Arroyo, T. (2013) 'Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.)', *European Food Research and Technology*, 236(1), pp. 193–207.

## 1. PLANTEAMIENTO DE TESIS

- Cray, J. A., Bell, A. N. W., Mswaka, A. Y., Timson, D. J. y Hallsworth, J. E. (2013) 'The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds?', *Microbial Biotechnology*, 6, pp. 453–492.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D. y Querol, A. (1998) 'The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking', *International Microbiology*, 1(2), pp. 143–148.
- Ferraro, L., Faticenti, F. y Ciani, M. (2000) 'Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*', *Process Biochemistry*, 35(10), pp. 1125–1129.
- Fleet, G. H. (2008) 'Wine yeasts for the future', *FEMS Yeast Research*, 8(7), pp. 979–995.
- Fleet G. H., y Heard, G. M. (1993) 'Yeast growth during fermentation', in Fleet, G.H. (ed.) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Switzerland: Harwood Academic Publishers, pp. 27–54.
- Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H. y Henschke, P. A. (2006) 'Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation', *FEMS Yeast Research*, 6(1), pp. 91–101.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H. y Pretorius, I. S. (2003) 'The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), pp. 63–69.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H. y Pretorius, I. S. (2006) 'The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), pp. 15–39.
- Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Sangorrín, M., Querol, A. y Caballero, A. C. (2007) 'Patagonian wines: The selection of an indigenous yeast starter', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(8), pp. 539–546.
- Pallioti, A., Tombesi, S., Silvestroni, O., Lanari, V., Gatti, M. y Poni, S. (2014) 'Changes in vineyard establishment and canopy management urged by earlier climate-related grape ripening: A review', *Scientia Horticulturae*, 178, pp. 43–54.
- Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T. y Escribano-Bailón, M. T. (2014) 'Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency', *Food Chemistry*, 154, pp. 44–51.
- Rainieri, S. y Pretorius, I. S. (2000) 'Selection and improvement of wine yeasts', *Annals of Microbiology*, 50, pp. 15–31.
- Renault, P., Coulon, J., Revel, G. De, Barbe, J. y Bely, M. (2015) 'Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement', *International Journal of Food Microbiology*, 207, pp. 40–48.
- Rodríguez, M. E., Infante, J. J., Molina, M., Domínguez, M., Rebordinos, L. y Cantoral, J. M. (2010) 'Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery', *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), pp. 1292–1302.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F. y Manzanares, P. (2001) 'Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts', *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), pp. 283–289.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F. y Manzanares, P. (2003) 'Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 181–188.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. y Capece, A. (2003) 'Function of yeast species and strains in wine flavour', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 169–180.
- Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H. y Henschke, P. A. (2000) 'Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), pp. 21–30.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. y Pretorius, I. S. (2005) 'Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), pp. 139–173.

Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. (2012) 'Genetic diversity in commercial wineries: Effects of the farming system and vinification management on wine yeasts.', *Journal of Applied Microbiology*, 112(2), pp. 302–315.

Vaudano, E. y García-Moruno, E. (2008) 'Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis', *Food Microbiology*, 25(1), pp. 56–64.

Wang, C., Esteve-Zarzoso, B. y Mas, A. (2014) 'Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization', *International Journal of Food Microbiology*, 191, pp. 1–9.

Whitener, M. E. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M. y Vrhovsek, U. (2017) 'Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), pp. 179–192.

Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F. y Comi, G. (1993) 'Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*', *Biotechnology Letters*, 15(3), pp. 235–238.



## 2. INTRODUCCIÓN



<b>2.1. La uva y el vino .....</b>	<b>30</b>
2.1.1. Historia del vino .....	31
2.1.2. Esquema de la uva.....	33
2.1.3. Composición de la uva y el vino .....	34
2.1.4. Elaboración de vinos blancos .....	38
<b>2.2. El vino de Madrid .....</b>	<b>40</b>
2.2.1. D.O. “Vinos de Madrid” .....	41
2.2.2. Finca El Encín .....	43
2.2.3. Finca El Socorro.....	45
2.2.4. La variedad Malvar ( <i>Vitis vinifera</i> L. cv.).....	45
<b>2.3. Levaduras en el vino .....</b>	<b>47</b>
2.3.1. Microbiología del vino .....	47
2.3.2. Factores que afectan al crecimiento de las levaduras durante la fermentación....	49
<u>2.3.2.1. Factores físico-químicos.....</u>	<u>49</u>
2.3.2.1.1. <i>Presión osmótica</i> .....	49
2.3.2.1.2. <i>Nutrientes</i> .....	51
2.3.2.1.3. <i>Temperatura</i> .....	52
2.3.2.1.4. <i>Etanol</i> .....	53
2.3.2.1.5. <i>Oxígeno</i> .....	54
2.3.2.1.6. <i>SO<sub>2</sub></i> .....	55
2.3.2.1.7. <i>pH</i> .....	55
<u>2.3.2.2. Factores biológicos .....</u>	<u>56</u>
2.3.2.2.1. <i>Contactos célula a célula</i> .....	56
2.3.2.2.2. <i>Compuestos con efecto killer</i> .....	57



2.3.3. Fermentación espontánea <i>versus</i> inoculada .....	58
2.3.4. La importancia de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> .....	60
2.3.5. Nuevas tendencias de inoculación de levaduras .....	63
<b>2.4. Técnicas de caracterización y cuantificación de levaduras</b> .....	<b>65</b>
2.4.1. Métodos tradicionales <i>versus</i> métodos moleculares .....	65
2.4.2. Fenotipo Microarray (PM) para caracterización .....	67
2.4.3. PCR cuantitativa (qPCR) para cuantificación .....	67
2.4.4. PCR-SSR o de microsatélites para caracterización de levaduras de la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	69
<b>2.5. Metabolitos de interés en el vino</b> .....	<b>69</b>
2.5.1. El aroma en el vino.....	70
<u>2.5.1.1. Clasificación de aromas</u> .....	70
<u>2.5.1.2. Compuestos volátiles producidos en la fermentación</u> .....	71
2.5.1.2.1. <i>Alcoholes superiores</i> .....	72
2.5.1.2.2. <i>Ésteres</i> .....	74
2.5.1.2.3. <i>Ácidos grasos</i> .....	76
2.5.2. Polisacáridos y oligosacáridos en el vino.....	76
<u>2.5.2.1. Polisacáridos</u> .....	77
2.5.2.1.1. <i>Polisacáridos procedentes de la uva</i> .....	78
2.5.2.1.2. <i>Polisacáridos procedentes de las levaduras</i> .....	82
<u>2.5.2.2. Oligosacáridos</u> .....	86
<b>2.6. Análisis sensorial</b> .....	<b>88</b>
2.6.1. Pruebas analíticas: discriminativas y descriptivas .....	89
2.6.2. Pruebas afectivas o hedónicas .....	89
<b>2.7. Bibliografía</b> .....	<b>90</b>

La introducción se ha dividido en seis apartados. En un primer apartado, se define el concepto de vino hablando de su historia, así como se analiza la estructura y composición de la uva y se describe el sistema de elaboración de vinos blancos. En el apartado 2.2., se particulariza en el vino de Madrid, su denominación de origen (D.O.), se ubican y describen las zonas implicadas y relacionadas con el estudio que se presenta en este trabajo de investigación, además de describir la variedad de uva blanca Malvar empleada en las elaboraciones. El apartado 2.3. centra el tema de la Tesis sobre levaduras, como microorganismos imprescindibles en el proceso de fermentación, en los siguientes subapartados se aborda la evolución de las diferentes especies de levaduras a lo largo de la fermentación y los factores que influyen en su crecimiento, así como la importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* en la microbiología del vino actual y los estilos y nuevas tendencias en el proceso de fermentación. En el apartado 2.4. se citan técnicas de caracterización y cuantificación de levaduras, profundizando más en las técnicas empleadas en esta Tesis. Teniendo en cuenta que el aroma de un vino es una de las características organolépticas que definen su calidad, se hace referencia en el apartado 2.5. a los compuestos volátiles producidos durante la fermentación. En este mismo apartado y considerando los efectos positivos que los carbohidratos complejos aportan al vino se realiza una descripción bibliográfica sobre el estudio de polisacáridos y oligosacáridos presentes en el vino, procedentes de la uva o de las levaduras. Finalmente, como parte importante en la elaboración de esta tesis, dada la importancia de un buen análisis sensorial que ayude a describir su aportación al vino, en el apartado 2.6. se ha hecho referencia a este aspecto, a veces, tan descuidado a nivel científico. Todos los apartados tratados en la introducción se han abordado a lo largo del desarrollo de este trabajo. Este estudio ha conducido al conocimiento de la interacción del género *Saccharomyces* junto a cepas de levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones mixtas y secuenciales, con el objetivo principal de mejorar y de disponer de herramientas para mejorar la calidad del vino de la variedad Malvar, cultivada mayoritariamente en la D.O. “Vinos de Madrid”.

## 2.1. La uva y el vino

La definición de vino establecida por la Ley Española 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino es: “El alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva”. Esta definición queda delimitada con la que propone la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV): “El vino es, exclusivamente, la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva. Su contenido en alcohol adquirido no puede ser inferior a 8,5% en volumen. No obstante, teniendo en cuenta las condiciones del clima, del suelo o de la variedad, de factores cualitativos especiales o de tradiciones propias de ciertas regiones, el grado alcohólico total mínimo podrá ser reducido a 7% en volumen por una legislación particular en la región considerada” (Definición 18/73, Ficha Código OIV I.3.1-1, Edición 01/2016).

### 2.1.1. Historia del vino

La trayectoria del vino discurre en paralelo con la civilización, los historiadores creen que el vino fue probado por primera vez en el Cáucaso y Mesopotamia ya en el año 6000 a.C. (Chambers y Pretorius, 2010). Referencias del vino han sido encontradas en Egipto y Fenicia en el año 5000 a.C., siendo producido en la Grecia continental y en Creta desde el 2000 a.C. La colonización de los romanos extendió la elaboración del vino a lo largo de todo el Mediterráneo; y se elaboró en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y el norte de África desde el 500 a.C. El cultivo de la vid se propagó a los Estados balcánicos, y los romanos lo expandieron a Alemania y otras partes del norte de Europa, hasta alcanzar Gran Bretaña (Robinson, 1994).

Los exploradores europeos introdujeron la vid en el Nuevo Mundo en el siglo XVI. En 1530, los conquistadores españoles cultivaron la *Vitis vinifera* en México, Argentina, Perú y Chile. En 1655, colonos holandeses plantaron esquejes de vid en Sudáfrica en las laderas bajas de Table Mountain en Cabo de Buena Esperanza. Las plantaciones en California llegaron más tarde y, en Australia y en Nueva Zelanda más de un siglo después, en 1813.

Un desastre golpeó el mundo del vino en los años 1870, cuando el insecto *Phylloxera vastatrix* (*Dactylasphaera vitifoliae*) arrasó casi todas las vides en Europa y el Nuevo Mundo. Éstas fueron extraídas y reemplazadas con nuevas vides *V. vinifera*

injertadas en portainjertos resistentes a la filoxera procedentes de vides nativas americanas. A pesar de los ataques por la filoxera y la propagación de otras enfermedades, como mildiu lanoso (*Plasmopara viticola*) y mildiu polvoroso (*Oidium tuckerii*), según informa la OIV, actualmente hay 7,5 millones de hectáreas de viñedo en todo el mundo, principalmente concentradas en las zonas templadas. En cuanto a la superficie de viñedo cultivada, España ocupa el primer lugar con una superficie de 975.000 hectáreas cultivadas, seguido de China que ha alcanzado entre los años 2000 y 2016 las 847.000 hectáreas; entre los años 2000 y 2014, la producción de uva de mesa en China creció más de un 80%. En cuanto a la producción de vino en 2016, España ocupa el tercer lugar a nivel mundial precedido de Italia y Francia, y seguido por Estados Unidos, Australia y China.

El conocimiento científico del proceso de elaboración de vino se inició con los estudios de Louis Pasteur, en 1863, quien demostró que los vinos son el producto de la fermentación alcohólica del mosto de uva por las levaduras, basando su trabajo en la primera observación al microscopio de células de levaduras por Antoine van Leeuwenhoek en 1680 y las afirmaciones de otros tres pioneros, Cagniard de la Tour, Schwann y Kützing a finales de los años 1830, que aseguraban que estas células son organismos vivos (Barnett, 1998). Con el conocimiento de que la levadura es la responsable de la biotransformación de los azúcares del mosto (principalmente glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, los productores de vino podrían tomar el control del proceso desde el viñedo hasta la botella. Posteriormente, las levaduras con mejores características fueron seleccionadas y, hacia 1890, Müller-Thurgau introdujo el concepto de cultivos puros de levadura en los procesos fermentativos. Hasta hoy día, la producción de vino de calidad se ha visto incrementada gracias a los avances ocurridos para el mejor entendimiento de la ecología, bioquímica, fisiología y biología molecular de las levaduras relacionadas con la producción del vino (Fleet, 2008), y de cómo estas levaduras impactan en la química del vino, en sus propiedades sensoriales y en la calidad del producto final (Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Fleet, 2007; Swiegers et al., 2005).

Hasta los inicios del siglo XVII, el vino era considerado como la única bebida saludable fácilmente almacenable. Hoy, el vino es sinónimo de cultura y estilo de vida alrededor del mundo, complementado por la comida, el entretenimiento y las artes. El vino juega un papel importante en la economía de muchos países, ya que se producen en torno a 260 millones de hectolitros de vino anuales (datos presentados por la OIV sobre la producción de 2016). Actualmente, los productores de vino ofrecen una amplia variedad de vinos al año

independientemente del lugar y el momento de consumo. Una gran competencia por la cuota de mercado ha dado lugar a un incremento en la diversidad e innovación en la industria del vino, en beneficio del consumidor (Pretorius, 2000).

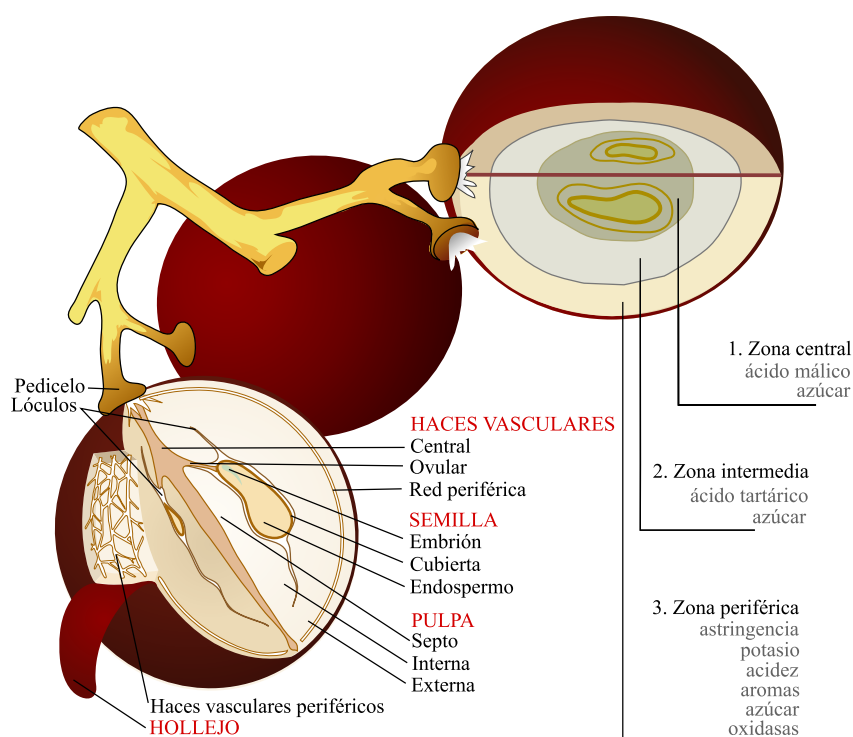
### 2.1.2. Esquema de la uva

En la estructura de la uva se diferencian tres partes principales: pulpa, hollejo y semillas (Figura 1). La pulpa ocupa la mayor parte de la baya, está formada por un núcleo central de haces vasculares conectado a una red de venas que rodea el borde exterior de la pulpa y proporciona una conexión vascular con el resto de la uva; las venas contienen el xilema, que transporta agua y minerales desde las raíces, y el floema que es la importante vía de transporte de los azúcares desde las hojas (Robinson, 1994). Las células de la pulpa interna están alargadas radialmente y son las de mayor tamaño, dando a esta parte una textura más frágil. Otra zona con diferente textura es el llamado pincel, que es una parte ligeramente coloreada de la pulpa cerca de la unión con el pedicelo.

El hollejo es la capa resistente que envuelve y protege la uva. Su capa externa consta de láminas de cera y cutina, ambas resistentes a la difusión de agua y, por lo tanto, evita la pérdida de agua desde el interior de la uva. También, impide la penetración de esporas de hongos y otras infecciones biológicas. Esta capa cerosa llamada pruina, constituye la superficie blanquecina de la uva. Los ácidos grasos y esteroides de la pruina suministran nutrientes para el crecimiento de las levaduras, ya sean inoculadas o procedentes del ambiente, durante la fermentación. Las capas de células que se sitúan bajo la cera y la cutina, forman el hollejo; la primera constituye la verdadera epidermis. Por debajo de ésta, hay del orden de siete capas de células más que forman la hipodermis y es donde se concentran la mayoría de los pigmentos de la uva. Tanto los taninos como una cantidad significativa de compuestos aromáticos de la uva se han descrito en estas capas. Además de las diferencias existentes en compuestos fenólicos del hollejo respecto a la pulpa subyacente, cabe destacar un mayor contenido de potasio en el hollejo.

Las semillas de la uva varían en número, tamaño y forma dependiendo de la variedad de uva. Su número tiende a ser característico de cada variedad, normalmente se encuentran de una a dos por grano de uva. Las semillas también tienen importancia en la elaboración de vino, si son estrujadas, los taninos amargos que contienen son liberados. A diferencia del raspón, que es relativamente fácil de separar de la uva, las semillas siempre

acompañan al mosto y los hollejos, tanto en el tanque o prensa en vinos blancos como en el tanque de fermentación en el caso de vinos tintos (Coombe, 1992).



**Figura 1.** Estructura y composición química de la baya madura.

Los distintos tejidos que forman el fruto contribuyen de manera diferente a la composición final del mosto y del vino (Figura 1). La pulpa aporta el agua que constituye entre un 75–90% del volumen del mosto y componentes mayoritarios del metabolismo primario como son los azúcares, glucosa y fructosa, y los ácidos orgánicos, fundamentalmente los ácidos málico y tartárico (Bejarano y Martínez Zapater, 2013). El hollejo aporta un gran número de compuestos que contribuyen al carácter varietal del vino. Entre ellos destacan los compuestos fenólicos solubles que aportan color y sabor del vino, y los compuestos aromáticos que contribuyen al sabor y al aroma (Conde et al., 2007; Lund y Bohlmann, 2006).

### 2.1.3. Composición de la uva y el vino

La composición de la uva es la base fundamental en la calidad del vino, y su conocimiento es vital para una correcta elaboración del vino (Robinson, 1994). Las concentraciones de cada uno de los grupos de compuestos químicos juegan un papel

importante en el vino final. Entre los principales componentes en las uvas y/o en el vino son (Jackson, 2000):

- i) Agua: el contenido en agua de las uvas y el vino es del 75–90% del contenido total. Por lo tanto, como compuesto químico predominante de uvas y vino, el agua juega un papel fundamental en el establecimiento de las características básicas de éste. También es un componente esencial en muchas de las reacciones químicas implicadas en el crecimiento de la uva, la fermentación del mosto y en el envejecimiento del vino.
- ii) Azúcares: los azúcares principales de la uva son glucosa y fructosa; estos suelen encontrarse en proporciones prácticamente iguales en uvas maduras, mientras que en uvas sobremaduras a menudo hay mayor proporción de fructosa. Otros azúcares diferentes a la glucosa y fructosa pueden estar presentes, pero en cantidades relativamente insignificantes. El contenido en azúcar de la uva es crítico para el crecimiento y metabolismo de las levaduras. La principal levadura del vino, *Saccharomyces cerevisiae*, obtiene principalmente la energía para su metabolismo a partir de glucosa y fructosa. En vinos secos, el contenido de azúcares residuales consiste principalmente en pentosas como arabinosa, ramnosa, xilosa y pequeñas cantidades de glucosa y fructosa no fermentadas ( $< 4 \text{ g L}^{-1}$ ). Tras la fermentación, el etanol es el subproducto más importante, pero además los azúcares son metabolizados a alcoholes superiores, ésteres de ácidos grasos y aldehídos, los cuales aportan características diferenciales a los vinos debido a su carácter aromático diferenciado.
- iii) Etanol: es el principal subproducto orgánico de la fermentación, representando un 10–15% de la composición del vino. Los factores principales que controlan la producción de etanol en el vino son el contenido en azúcares del mosto, la temperatura y la cepa de levadura. Organolépticamente tiene múltiples efectos en el sabor y la sensación en boca ya que influye directamente en el dulzor del vino debido a su propio sabor dulce. De manera indirecta influye en la percepción de la acidez del vino contribuyendo a que los vinos ácidos parezcan más equilibrados. A altas concentraciones, produce una sensación ardiente y confiere cuerpo al vino, especialmente en vinos secos. El etanol puede también incrementar la intensidad de

amargor mientras disminuye la sensación de astringencia producida por los taninos (Lea y Arnold, 1978).

- iv) Glicerol: en un vino seco, el glicerol es normalmente uno de los compuestos mayoritarios, después del agua y el etanol. Su concentración en vino puede variar entre uno y diez gramos por litro aproximadamente (Radler y Schütz, 1981). Con un nivel umbral de detección de 5,2 gramos por litro en vino blanco seco, participa en el dulzor, cuerpo y volumen del vino y puede mejorar la calidad de éste (Noble y Bursick, 1984). La habilidad de producir glicerol es una característica deseable en las levaduras (Degré, 1993) y varios son los factores que afectan a la producción de glicerol por las levaduras incluidos la cepa, nivel de inoculación, aireación, temperatura, y contenido en azúcar y sulfitos (Gardner et al., 1993).
- v) Ácidos orgánicos: estos ácidos proceden tanto de la uva como de los procesos fermentativos y contribuyen a la acidez del vino. En uvas, los ácidos tartárico y málico constituyen más del 90% de la acidez fija. Los ácidos no sólo producen un sabor refrescante (o ácido, si están en exceso), también modifican la percepción de otros sabores o sensaciones en boca, como el carácter dulce del vino. Además, la liberación de los ácidos de las vacuolas celulares durante el estrujado de la uva, es probablemente el inicio de la hidrólisis ácida de los precursores no volátiles en la fruta (Winterhalter et al., 1990). Durante la fermentación y el envejecimiento, los ácidos están implicados en las reacciones que llevan a la formación de ésteres, importantes en el aroma fresco y afrutado de los vinos. El papel de los ácidos en el mantenimiento de un bajo pH es crucial en la estabilidad de color en vinos tintos. También, un bajo pH producido por los ácidos del vino tiene un efecto antimicrobiano beneficioso, ya que inhibe el crecimiento de bacterias indeseadas y, aumenta las propiedades antimicrobianas de los ácidos grasos (Doores, 2005).
- vi) Polifenoles: son compuestos que provienen de la uva y los raspones, pueden ser producidos por el metabolismo de las levaduras o ser extraídos durante la fermentación o el envejecimiento del vino en madera. Están relacionados con el color, fragancia, astringencia y amargor del vino y se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Se clasifican en dos grupos, los flavonoides: flavonoles, catequinas (flavan-3-oles), y, en vinos tintos, antocianos; y, los no



flavonoides: ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y estilbenos (Romero Cascales, 2008).

vii) Sales minerales: en las uvas y el vino se encuentran elementos minerales. En la mayoría de las situaciones, la concentración mineral refleja las características de adsorción de las cepas de vid, la acumulación por el portainjerto, y la influencia del clima en la tasa de transpiración. De este modo, las uvas de climas cálidos presentan mayor contenido en potasio que aquellas que crecen en regiones con climas templado o frío. En general, los minerales constituyen el 0,4% del peso de la uva y aportan los cationes (potasio, calcio, magnesio y sodio) y aniones (sulfatos, fosfatos y cloratos) que regulan el pH del mosto y el balance iónico de las levaduras (Ough y Amerine, 1988).

viii) Vitaminas: estos compuestos están relacionados con la regulación de la actividad celular. Se encuentran en pequeñas cantidades en uvas, mosto y vino y, su concentración generalmente disminuye durante la fermentación y el envejecimiento del vino. En este sentido, el ácido ascórbico (vitamina C) se oxida rápidamente tras el estrujado de la uva; la tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) es degradada por la reacción con el SO<sub>2</sub>, calentamiento o incorporación de bentonita; y la riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) es oxidada tras la exposición a la luz. La única vitamina que aumenta durante la fermentación es el ácido paraaminobenzoico (PABA), como intermediario en la vía del ácido shikímico, la ruta metabólica central que lleva a la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Braus, 1991). Aunque los niveles de vitaminas en el vino no son significativos en la nutrición humana, normalmente si son suficientes para el crecimiento microbiano. El contenido de biotina (vitamina H) y ácido nicotínico (niacina) son adecuados para la mayoría de cepas de levadura.

ix) Sustancias nitrogenadas: los compuestos nitrogenados presentes en el mosto y en el vino desempeñan un papel importante en la fermentación de las levaduras. Las cantidades de estos compuestos oscilan entre 60–2.400 mgN L<sup>-1</sup> y se encuentran en formas inorgánicas como amonio y nitratos y, diversas formas orgánicas que incluyen las aminas, amidas, pirazinas, bases nitrogenadas, pirimidinas, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, las levaduras sólo pueden asimilar parte de estos compuestos, este conjunto de compuestos constituye el nitrógeno fácilmente

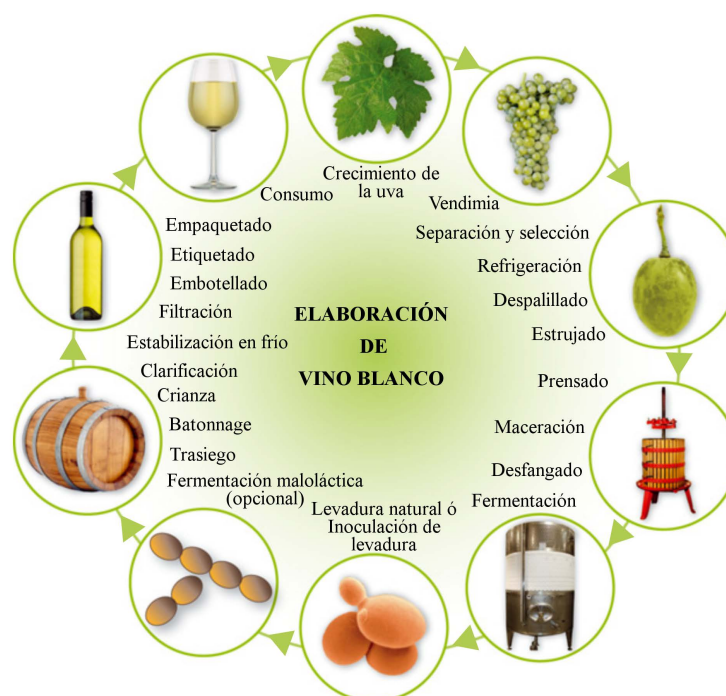
asimilable (NFA), en inglés YAN (yeast assimilable nitrogen). Los compuestos que forman el NFA son el ión amonio y el nitrógeno amínico primario aportado por los aminoácidos (Zoecklein et al., 2001). Y aunque los compuestos nitrogenados orgánicos complejos (pirimidinas, proteínas y ácidos nucleicos) son esenciales para el crecimiento y el metabolismo de la uva y las levaduras, rara vez se relacionan directamente con propiedades sensoriales en el vino. Ocasionalmente, las proteínas coloidales causan enturbiamiento en el vino (Jackson, 2000).

- x) Sustancias pécticas y polisacáridos: son polímeros mucilaginosos de azúcares que normalmente forman complejas cadenas ramificadas y se encuentran en las paredes celulares de la uva (hollejo y pulpa). Propiedades sensoriales de los vinos como color, sabor y textura al paladar dependen de varios factores incluyendo la solubilización de polisacáridos desde las paredes celulares de la uva al mosto durante la elaboración del vino (Vidal et al., 2003), la modificación de polisacáridos por enzimas endógenas y la difusión de antocianos de la uva al mosto.

### 2.1.4. Elaboración de vinos blancos

Formalmente, el proceso de vinificación comienza cuando las uvas llegan a la bodega (Figura 2). Las uvas son recolectadas en un estado de madurez apropiado que determina la composición química del mosto extraído de ellas. Son particularmente importantes los azúcares y los ácidos que son los constituyentes mayoritarios del mosto (Fleet, 2007). Tras la vendimia, se hace una selección del material vegetal, de manera manual o automatizada, retirando las hojas y material indeseable que acompaña a las uvas vendimiadas (Falconer y Hart, 2005).

Para la elaboración de vino blanco, las uvas son mecánicamente despalilladas y estrujadas (o prensadas), y el mosto obtenido se separa de las pieles; aunque también puede llevarse a cabo un proceso de maceración en frío donde la uva estrujada se mantiene a bajas temperaturas junto con los hollejos para favorecer la extracción de compuestos aromáticos, así como otros compuestos que aportan estructura al vino. Esta maceración, en la elaboración de vino blanco, se mantiene el mínimo tiempo, nunca más de unas pocas horas (Jackson, 2014).



**Figura 2.** Esquema de los principales pasos en la elaboración de vino blanco (adaptado de Jolly et al. 2014).

A continuación, si es necesario el mosto se clarifica para conseguir un mosto limpio. Los principales métodos empleados son la decantación en frío, filtración, centrifugación o una combinación de estos métodos. La decantación en frío se realiza generalmente a temperaturas de 5° a 10°C durante 24–48 horas, este proceso se ve mejorado por la adición de enzimas pectolíticas para ayudar al desfogado del mosto (Fleet, 2007). El mosto limpio es transferido después al tanque de fermentación, donde ésta puede empezar de manera natural o ser iniciada por inoculación de levaduras seleccionadas (Ewart, 2003). Los vinos blancos normalmente son fermentados entre 10° y 18°C durante 7 a 14 días o más; la baja temperatura y la lenta velocidad de fermentación favorecen la retención de compuestos volátiles deseables (Fleet, 2007). La fermentación alcohólica se considera acabada cuando el contenido de azúcares fermentables del mosto, glucosa y fructosa, se encuentran por debajo de 4 g L<sup>-1</sup>. Después, normalmente en zonas de climas fríos, se favorece el desarrollo de la fermentación maloláctica por bacterias ácido lácticas (BAL), que mediante descarboxilación del ácido L-málico en ácido L-láctico reducen la acidez del vino, produciendo vinos más complejos con sabor más suave y fresco (Jackson, 2014).

El vino recién fermentado, se ha de proteger del oxígeno durante la maduración, para evitar su oxidación y la posible contaminación. Durante la maduración, se pierde el exceso de dióxido de carbono, los aromas a levadura se disipan y se inician los procesos que conducen a la producción del bouquet. La exposición al aire está normalmente limitada a procesos como el trasiego o el battonage (durante la maduración sobre lías) (Jackson, 2014). Después de varias semanas, el vino es trasegado. El trasego separa el vino de sólidos que sedimentan durante la clarificación espontánea o inducida. El sedimento consiste en células de levaduras y bacterias, restos de células de la uva y taninos, proteínas y tartratos precipitados; si se mantiene este sedimento en contacto con el vino puede provocar malos olores, así como favorecer la contaminación microbiana.

Antes del embotellado, el vino debe de ser estabilizado y clarificado para eliminar proteínas disueltas y otros materiales coloidales que podrían generar enturbiamiento, especialmente en vinos expuestos a calor. Normalmente, los vinos son refrigerados y filtrados para mejorar la limpidez y darles un aspecto más brillante.

Al embotellar, los vinos son generalmente tratados con una dosis baja de dióxido de azufre para limitar la oxidación y la contaminación (Rankine, 1989; Ewart, 2003).

### 2.2. El vino de Madrid



**Figura 3.** Mapa de la D.O. “Vinos de Madrid”

### 2.2.1. D.O. “Vinos de Madrid”

La Denominación de Origen (D.O.) “Vinos de Madrid” fue creada en 1990. Se encuentra localizada en la Comunidad de Madrid, en el centro de España y comprende tres subzonas vitivinícolas amparadas bajo esta D.O., Arganda, Navalcarnero y San Martín (Figura 3). El clima en la D.O. es mediterráneo continental y se caracteriza por temperaturas extremas tanto en verano (41°C máxima) como en invierno (−8°C mínima) y una pluviometría anual entre 460 y 660 mm.

La Ley 6/2015, de 12 de mayo, de Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas de ámbito territorial supraautonómico regula los términos tradicionales que indican que el vino está acogido a una Denominación de Origen. El término Denominación de Origen (D.O.) corresponde al nombre de una región, comarca, localidad o lugar determinado que haya sido reconocido administrativamente para designar vinos que cumplan las siguientes condiciones:

- i) El vino deberá disfrutar de un elevado prestigio en el tráfico comercial en atención a su origen.
- ii) La región, comarca o lugar a la que se refiera la Denominación de Origen, tendrá que haber sido reconocido previamente como ámbito geográfico de un vino de calidad con indicación geográfica con una antelación de, al menos, cinco años.
- iii) Su calidad y características son esencialmente o exclusivamente debidas a su origen geográfico, con sus factores humanos y culturales inherentes.

En España son más de 70 las D.O. establecidas (Fuente: MAPAMA, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente), siendo en la D.O. “Vinos de Madrid” donde se ha desarrollado el presente trabajo.

Según los datos aportados por el Consejo Regulador de la D.O. “Vinos de Madrid”, en la actualidad existen 8.390,85 hectáreas de viñedo inscritas, de las que se ocupan 2.891 viticultores madrileños, repartidas de la siguiente forma:

**Tabla 1.** Distribución en las subzonas de la D.O. “Vinos de Madrid”

Subzona	Superficie (ha)	Nº de parcelas	Nº Viticultores
Arganda	4.670,24	6.961,00	1.885
Navalcarnero	1.812,27	2.158,00	578
San Martín	1.908,34	2.367,00	428
Total:	8.390,85	11.486,00	2.891

**Tabla 2.** Extensión de viñedo (ha) de las variedades autorizadas por la D.O. “Vinos de Madrid” repartido en las tres subzonas y valor total (ha) de viñedo cultivado de cada variedad en la D.O. Fuente: Consejo Regulador de la D.O. “Vinos de Madrid”.

Variedad de uva	Subzona D.O. “Vinos de Madrid”			
	Arganda	Navalcarnero	San Martín	Total (ha)
Tempranillo	1.072,61	100,17	163,23	1.336,01
Garnacha Tinta	8,49	1.179,11	1.694	2.881,82
Malvar	1.833,48	220,00	0,93	2.054,41
Albillo Real	1,01	0,00	240,73	241,74
Airén	877,76	38,32	4,69	920,77
Moscatel Grano Menudo	6,01	1,81	7,64	15,46
Negral	1,10	55,00	0,00	56,10
Cabernet Sauvignon	70,95	15,34	42,40	128,69
Merlot	49,98	8,40	40,81	99,19
Syrah	100,04	15,97	55,89	171,90
Torrontés	7,28	0,00	0,00	7,28
Macabeo	9,89	0,38	7,00	17,27
Parellada	0,00	0,67	25,88	26,55
Sauvignon Blanc	1,00	0,00	0,00	1,00
Graciano	3,00	0,00	0,00	3,00
Petit Verdot	0,00	0,00	0,00	0,00

Esta D.O. está constituida por 46 bodegas repartidas en las tres subzonas que la conforman: Arganda (27 bodegas), Navalcarnero (5 bodegas) y San Martín (14 bodegas). Las variedades de uva preferentes son Malvar y Albillo Real (blancas), y Garnacha y

Tempranillo (tintas) (*Vitis vinifera* L. cv.). La variedad de uva Malvar, empleada en las fermentaciones elaboradas en esta tesis, es una variedad autóctona para esta D.O. cuyo cultivo en Madrid es documentado ya en 1885 por Abela (Abela y Sáinz de Andino, 1885), siendo la variedad con mayor extensión de viñedo en la D.O. “Vinos de Madrid” (Tabla 2). Otras variedades autorizadas en la D.O. son: Airén, Macabeo o Viura, Moscatel de grano menudo, Parellada, Torrontés o Alarije, Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Graciano, Negral o Garnacha tintorera, Petit Verdot y Syrah.

En la Tabla 2, se muestra la distribución de las variedades de uva autorizadas actualmente en cada subzona de la D.O., expresada como hectáreas de viñedo cultivado, así como la extensión de viñedo total de cada variedad presente en la D.O. “Vinos de Madrid”. Parte del desarrollo económico en este área está basado en la producción de vino, en la que los bodegueros buscan la producción de vinos de alta calidad y con identidad propia (Gil et al., 2006).

#### 2.2.2. Finca El Encín

La finca experimental de “El Encín” (Figura 4) pertenece al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), se encuentra situada en la localidad madrileña de Alcalá de Henares (40° 31' N, 3° 17' W y 610 m de altitud) en el marco de la subzona de Arganda (Figura 5).



**Figura 4.** Zona de vides cultivadas en la finca “El Encín”

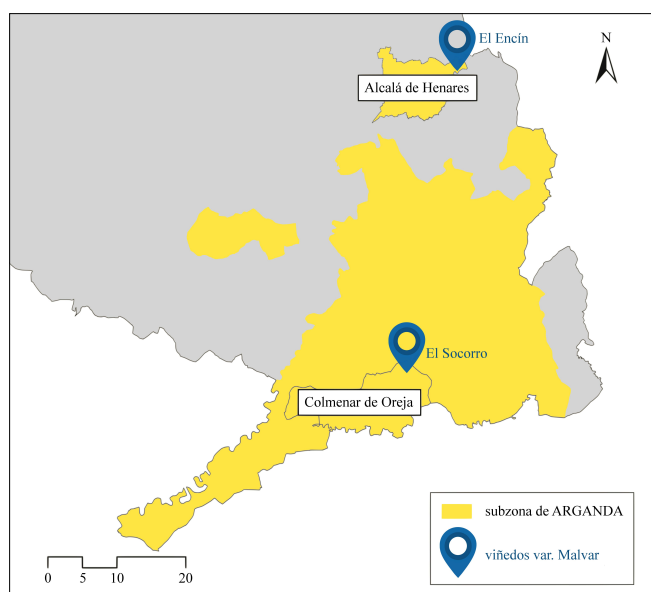


En la actualidad, en la finca “El Encín” se conserva una Colección de Variedades de Vid con 10 hectáreas de viñedo y que está formada por 3.532 accesiones: 855 portainjertos, 69 híbridos productores directos, 111 *Vitis* spp. (silvestres) y 1.855 *Vitis vinifera* (1.178 de vinificación, 674 de mesa y 648 *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*), es considerada la más grande de España y la tercera del mundo. En total, hay 364 plantas de la variedad Malvar en la Finca “El Encín” situadas en dos parcelas (nº5 y nº15), variedad utilizada durante el desarrollo de esta tesis.

En esta finca también se encuentra la bodega experimental del IMIDRA donde se realizan trabajos de investigación y experimentación enológica. En los últimos años, se estudian las características de adaptación y las aptitudes enológicas de variedades tradicionales y minoritarias de uva, además de la aplicación de diferentes prácticas vitícolas y técnicas de elaboración y su incidencia enológica. Esta bodega también realiza ensayos con levaduras autóctonas incluidas en la Colección de Levaduras del IMIDRA (CLI). Así se pretende definir un modo de elaboración idóneo para cada variedad de uva en estudio, que lleve a la mejora de la calidad de los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid”. Además, se investiga la utilización en enología de sensores electrónicos (“nariz electrónica”) para la monitorización a tiempo real de vinificaciones, tanto del proceso de fermentación alcohólica como fermentación maloláctica (Arroyo et al., 2009; Lozano et al., 2015).

La bodega experimental cuenta con instalaciones que permiten trabajar de forma análoga a las técnicas empleadas en las bodegas comerciales de la zona con lo que se pretende cumplir con el objetivo de “planta piloto”, cuyos resultados sean transponibles directamente al sector vinícola madrileño. Además, dada la necesidad de realizar los ensayos de forma estadística y con ello hacer las repeticiones de las microvinificaciones necesarias, se impone trabajar en volúmenes pequeños, a escala, de cómo lo realizan las bodegas comerciales, única diferencia trascendente en el modo de trabajo frente al que emplean éstas. Se cuenta con instalación de frío para el control de temperatura de fermentación, maquinaria enológica actualizada, sala de crianza con temperatura y humedad controlada, depósitos de acero inoxidable de 1.500, 750, 500, 100, 50, 25, 15, 12, 5 y 1 litros de capacidad para adaptarse a los diferentes ensayos realizados, depósitos siempre llenos de distinto volumen para conservación y equipo de embotellado para el adecuado almacenamiento y guarda de muestras.





**Figura 5.** Fincas en la subzona de Arganda de la D.O. “Vinos de Madrid” donde se sitúan los viñedos de uva Malvar empleada en esta tesis doctoral.

### 2.2.3. Finca El Socorro

La finca y Centro de Transferencia Tecnológica CTT “El Socorro” perteneciente al IMIDRA, se ubica en el municipio madrileño de Colmenar de Oreja ( $40^{\circ} 8' N$ ,  $3^{\circ} 22' W$  y 743 m de altitud) dentro de la subzona de Arganda (Figura 5). En este Centro se desarrolla una actividad investigadora y de transferencia dentro del ámbito vitivinícola, además de ofrecer apoyo técnico y docente al sector en su conjunto dentro de la Comunidad de Madrid. La finca tiene aproximadamente 20 hectáreas de viñedo cultivado divididas en 23 parcelas, dos de las cuales contienen cepas de la variedad de uva Malvar (parcela nº14 con una superficie de viñedo variedad Malvar de una hectárea y, parcela nº2 con cuatro repeticiones de 32 cepas de esta variedad de uva).

### 2.2.4. La variedad Malvar (*Vitis vinifera* L. cv.)

La uva Malvar tiene escasa presencia en España en comparación con otras variedades, aunque es considerada una variedad preferente en la D.O. “Vinos de Madrid”. También está autorizada en otras D.O., pertenecientes a Castilla-La Mancha, con plantaciones están localizadas sobre todo en Guadalajara, Cuenca y Toledo, en zonas limítrofes a Madrid.

Se trata de una variedad productiva de porte erguido, con racimos grandes y sueltos, de forma cilíndrica (Figura 6). Presenta una maduración media, hacia principios o mediados de septiembre, adelantada con respecto a la variedad Airén.

Los mostos de esta variedad presentan una acidez insuficiente la mayoría de los años. Así, en el rango entre los años 2010-2017, la acidez mostró valores medios de  $4 \text{ g L}^{-1}$  para un grado alcohólico probable (GAP) de 11,7; entre  $3-4 \text{ g L}^{-1}$  para valores de 12-12,5 de GAP; y claramente deficientes, especialmente los últimos años, donde el GAP alcanzó los  $13^\circ$  y la acidez se situó en torno a los  $3 \text{ g L}^{-1}$  siendo los valores más bajos los correspondientes a los años 2015 y 2017, con 2,6 y  $2,8 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 6.** *Vitis vinifera* variedad Malvar en la Finca “El Encín”, IMIDRA

Un estudio de caracterización del perfil aromático en diferentes variedades en la D.O. “Vinos de Madrid” (Santos et al., 2004), destacó los vinos elaborados con la variedad Malvar como los más aromáticos y con alto contenido en compuestos volátiles de calidad, en unas concentraciones cercanas a variedades del noroeste de España como Albariño, Loureira y Godello, empleadas en la producción de vinos blancos (Versini et al., 1994).

De manera general, la variedad Malvar requiere de una corrección previa de la acidez que aporte frescura a los vinos resultantes. La intensidad aromática y cuerpo de los vinos Malvar es superior a la de vinos tradicionales de la variedad Airén, con predominio de los aromas frutales de macedonia, manzana, plátano y en ocasiones notas cítricas. Son vinos ligeros, adecuados para su consumo como vinos jóvenes, del año, y se mantienen

estables con el paso del tiempo. Desde hace algunos años se elabora en algunas bodegas, de forma minoritaria, fermentado o envejecido en barrica durante algunos meses. De este modo, se consiguen vinos más complejos por el aporte de la madera, y de mayor longevidad en el tiempo.

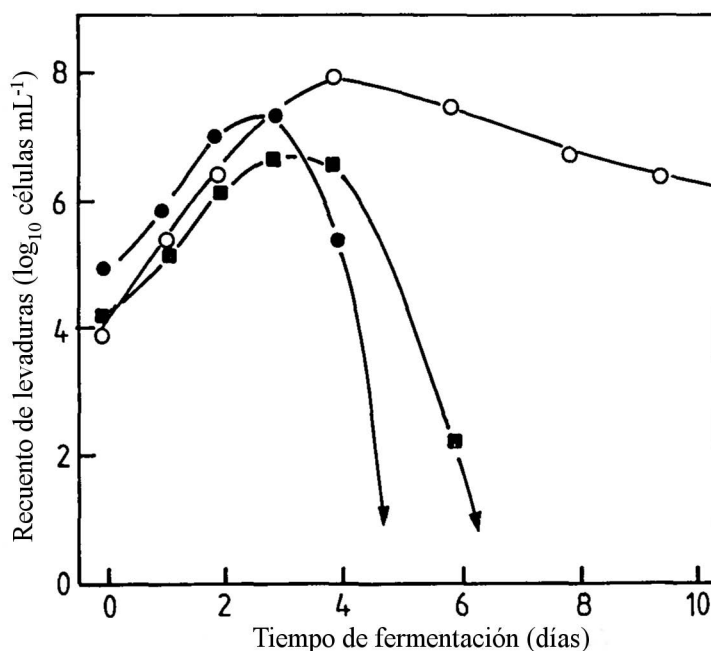
### 2.3. Levaduras en el vino

#### 2.3.1. Microbiología del vino

Desde los descubrimientos de Louis Pasteur, las levaduras y la fermentación alcohólica han incitado una considerable labor de investigación, haciendo uso de los avances en microbiología, bioquímica, genética y biología molecular (Ribereau-Gayon et al., 2000). La microbiota natural asociada con el proceso fermentativo es altamente compleja y formada por una gran variedad de microorganismos. Los microorganismos del mosto de uva provienen principalmente de la superficie de la uva y del equipo de bodega (Vaughan-Martini y Martini, 1995; Sabate et al., 2002). Generalmente, poca cantidad de levaduras ( $10\text{-}10^3$  ufc  $\text{g}^{-1}$ ) son detectadas en uvas inmaduras, pero las poblaciones pueden ir aumentando hasta valores de  $10^4\text{-}10^6$  ufc  $\text{g}^{-1}$  en uvas maduras previamente a la vendimia (Fleet, 2003). Todos estos valores son muy variables y dependen de la situación geográfica, las condiciones climáticas durante la maduración y el tratamiento fitosanitario del viñedo, entre otros (Ribereau-Gayon et al., 2000). Durante la maduración de la uva, los azúcares pasan de los tejidos internos de la baya a la superficie, promoviendo el crecimiento de las levaduras (Fleet, 2003).

Estudios ecológicos han encontrado que las levaduras apiculadas pertenecientes al género *Hanseniaspora* (y su forma anamorfa *Kloeckera*) son predominantes en la superficie de las uvas maduras, representando entre el 50 y 75% de la población total de levaduras (Fleet y Heard, 1993; Romano et al., 2006), mientras que especies de los géneros *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Torulaspora* están presentes en menor cantidad (Fleet y Heard, 1993). De manera sorprendente, la especie fermentativa por excelencia *S. cerevisiae* se encuentra en muy bajas cantidades en la superficie de uvas sanas o incluso en los suelos del viñedo (Martini et al., 1996; Cordero-Bueso et al., 2011, 2013). Sin embargo, la prevalencia de *Saccharomyces* como flora residente en las bodegas ha sido bien documentada, estas superficies pueden albergar múltiples cepas de *Saccharomyces* que se han acumulado

durante años provenientes de las uvas o de los inóculos empleados y pueden continuar en las campañas siguientes (Gutiérrez et al., 1999; Demuyter et al., 2004; Santamaría et al., 2005). En la Figura 7, se muestra una representación general del crecimiento de las levaduras durante la fermentación del mosto (Fleet, 1990).



**Figura 7.** Crecimiento generalizado de las especies de levaduras durante la fermentación alcohólica en vino (tomado de Fleet, 1990). ○, *S. cerevisiae*; ●, especies de *Hanseniaspora*; ■, especies de *Candida*. Pueden producirse cambios en las poblaciones iniciales y máximas para cada especie; en fermentaciones inoculadas con *S. cerevisiae*, la población inicial es aproximadamente  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> (Fleet y Heard, 1993).

La fermentación es iniciada por la acción de varias especies de levaduras no-*Saccharomyces* como, por ejemplo, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata*, *Candida colliculosa* y *Mestchnikowia pulcherrima*, así como especies de *Saccharomyces*. El crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* generalmente se limita a los primeros 2 a 4 días de la fermentación, después las poblaciones de estas levaduras disminuyen (Figura 7). No obstante, alcanzan poblaciones máximas de  $10^6$  a  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>, y este crecimiento es metabólicamente significativo en términos de sustratos utilizados, por tanto, no disponibles para *S. cerevisiae*, y por los productos finales liberados al vino (Romano et al., 2003). De forma general, la muerte de las especies no-*Saccharomyces* se ha relacionado con su sensibilidad al etanol, ya que su concentración aumenta conforme

la fermentación avanza (Kunkee, 1984). Después de 4 días, aproximadamente, la fermentación es continuada y completada por *S. cerevisiae* que alcanza poblaciones máximas en torno a  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ . En algunos casos, otras especies diferentes a *S. cerevisiae*, como *S. bayanus* y *S. paradoxus*, pueden ser las especies dominantes, especialmente en fermentaciones espontáneas a bajas temperaturas (Demuyter et al., 2004; Santamaría et al., 2005).

### 2.3.2. Factores que afectan al crecimiento de las levaduras durante la fermentación

La fermentación es un ambiente cambiante que expone a las levaduras a una serie de condiciones de estrés que afectan a su crecimiento, como una alta presión osmótica causada por altas concentraciones de azúcares, niveles altos de  $\text{SO}_2$ , carencia de oxígeno, pH bajo, baja disponibilidad de nutrientes (nitrógeno, lípidos y vitaminas), y toxicidad provocada por etanol (Fleet, 2007; Marsit y Dequin, 2015). A estos factores hay que añadir las interacciones que tienen lugar entre las levaduras durante la fermentación. Todos estos condicionantes, junto al hecho de que la fermentación del mosto de uva y su transformación en vino implica una variabilidad en el medio donde se desarrollan las levaduras, van a provocar que el ambiente que se encuentran las especies de levaduras presentes durante la fermentación no siempre sea favorable para el mismo grupo de levaduras. Por estos motivos se pasa a discutir cada uno de los principales factores (tanto físico-químicos como biológicos) que pueden alterar el crecimiento de uno u otro grupo microbiano durante una fermentación alcohólica.

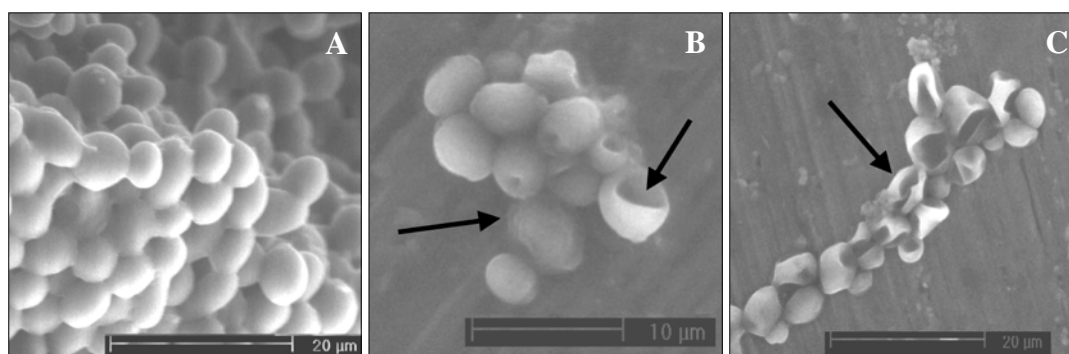
#### 2.3.2.1. Factores físico-químicos

##### *2.3.2.1.1. Presión osmótica*

Los azúcares fermentables consisten principalmente en hexosas (glucosa y fructosa) y se encuentran en diferentes concentraciones en el mosto dependiendo de la variedad de uva y el lugar de procedencia.

Cuando los mostos proceden de uvas sobremaduras con una alta concentración de azúcares ( $>200 \text{ g L}^{-1}$ ), implican una alta presión osmótica en el ambiente de fermentación que puede influir en varios aspectos como en la disminución de la viabilidad y crecimiento de las levaduras, así como en el rendimiento de la fermentación (Pratt et al., 2003). De manera principal, la alta densidad del mosto provoca condiciones hipertónicas

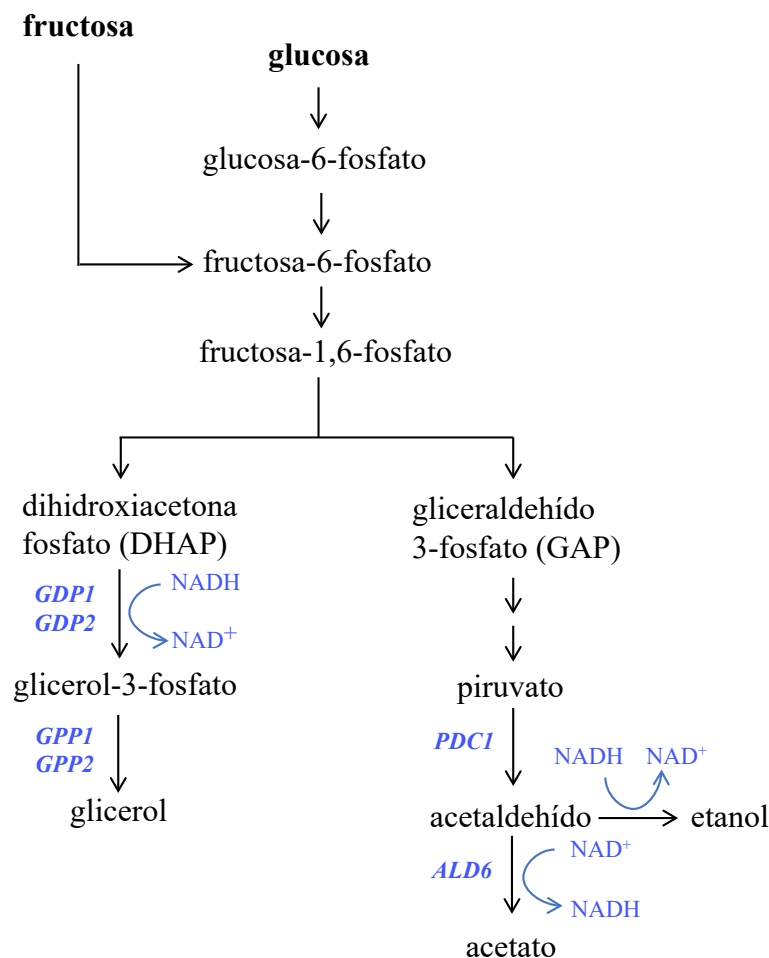
para la levadura desde el momento en el que es inoculada. Esta situación hipertónica provoca un flujo de agua hacia el exterior de la célula y una rápida pérdida de turgencia (Hohmann, 1997) (Figura 8B). Otro daño importante es que la elevada cantidad de etanol que se produce durante esta fermentación puede llevar a una alta toxicidad para las levaduras hacia el final de la fermentación (Gafner y Schültz, 1996). Walker y Birch (1998) informaron que cuando las levaduras están expuestas a un 10% (v/v) de etanol sufren aberraciones en la forma de su envoltura celular, de igual modo que se muestra en la Figura 8C.



**Figura 8.** Cambios morfológicos en una cepa de *S. cerevisiae* sometida a diversas condiciones (Pratt et al., 2003). A, control; B, exposición a sorbitol 20% (p/v) durante 15 minutos; C, exposición a etanol 10% (v/v) durante 15 minutos.

Se ha demostrado que las levaduras responden a una situación hiperosmótica con adaptaciones estructurales rápidas (Slaninova et al., 2000) o con estrategias adaptativas a más largo plazo (Bauer y Pretorius, 2000). La principal respuesta de las levaduras al ambiente hiperosmótico es la síntesis de metabolitos con efecto osmoprotector, en particular destaca la producción de glicerol (Nevoigt y Stahl, 1997). Esta molécula, que es producida normalmente en la fermentación en respuesta a la necesidad de conseguir un balance redox vía formación de  $\text{NAD}^+$ , tiene un papel fundamental como osmoprotector en las etapas iniciales de la fermentación en mostos con gran concentración de azúcares (Hohmann, 2002) (Figura 9). El exceso de  $\text{NAD}^+$  que se origina por la producción de glicerol hace activar el mecanismo de formación de acetato mediado por la aldehído deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  codificada por genes de la familia *ALD* (Navarro-Aviño et al., 1999; Noti et al., 2015). Debido a los mecanismos de adaptación a estrés osmótico, más de la mitad del glicerol y acetatos son producidos en las primeras etapas de

la fermentación alcohólica y su concentración tiene una importante influencia en la calidad del vino.



**Figura 9.** Metabolismo del carbono y balance redox en el proceso fermentativo de *S. cerevisiae* (adaptado de Jain et al., 2012).

#### 2.3.2.1.2. Nutrientes

El nitrógeno es un nutriente importante presente en cantidades limitadas en los mostos de uva, y su disponibilidad está directamente asociada con la producción de biomasa, la velocidad de fermentación y la producción de compuestos volátiles. Por ello, la deficiencia de nitrógeno es la causa más común de fermentaciones lentas o paradas en la fermentación (Bisson, 1999; Bell y Henschke, 2005; Sablayrolles, 2008). Para evitar estas paradas o ralentizaciones, suele ser común en la elaboración de vino, añadir una fuente nitrogenada suplementaria en forma de sales de amonio (sulfato o fosfato) o

aminoácidos (Gutiérrez et al., 2012). Normalmente, se consideran necesarias dosis de al menos 140 mg L<sup>-1</sup> de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) para completar la fermentación (Bell y Henschke, 2005), aunque este valor es dependiente de la concentración de azúcar del mosto (Martínez-Moreno et al., 2012).

Los lípidos son también nutrientes clave para las levaduras en la fermentación alcohólica. La síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados requiere oxígeno, y cantidades limitadas de estos nutrientes puede afectar negativamente a la viabilidad de las levaduras a final de fermentación (Luparia et al., 2004). En las tareas de estabilización del mosto, un proceso de clarificación intensa lleva a la limitación de la concentración de lípidos que se asocia directamente con la posterior pérdida de viabilidad de las levaduras. A su vez, estudios recientes han demostrado una relación entre el nivel de nitrógeno de los mostos y la concentración de lípidos en el proceso de fermentación, puesto que una alta disponibilidad de nitrógeno en el medio en asociación con una baja disponibilidad de lípidos, concretamente esteroides, conlleva una alta tasa de mortalidad celular (Tesnière et al., 2013).

Otros nutrientes importantes son las vitaminas. La tiamina, es rápidamente consumida por las levaduras, por lo que un ligero desarrollo de las levaduras nativas en el mosto podría causar el agotamiento de la tiamina con negativas consecuencias para la eficiencia de las levaduras inoculadas posteriormente y de su cinética fermentativa (Bataillon et al., 1996).

### 2.3.2.1.3. Temperatura

Durante la fermentación las levaduras liberan una importante cantidad de energía en forma de calor y cualquier cambio en la temperatura es percibido por las células como un factor causante de estrés (Piper, 1997). Una alta temperatura junto al incremento de etanol tienen efecto sinérgico y contribuyen a disminuir el crecimiento de las levaduras, que se ven afectadas a nivel de la integridad y permeabilidad de la membrana celular (Alexandre et al., 1994). Salvadó et al. (2011) evaluaron el efecto del incremento de concentraciones de etanol en rangos de 0% a 25% (v/v) y temperaturas entre 4 y 46°C, sobre la competencia entre *S. cerevisiae* y varias especies no-*Saccharomyces* (*H. uvarum*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida zemplinina*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces marxianus*) en la fermentación. Confirmaron que la producción de etanol no suponía una clara ventaja ecológica para *S. cerevisiae* (al menos no hasta que los niveles de etanol



superaban 9% v/v), mientras que un aumento de temperatura ( $>15^{\circ}\text{C}$ ) favorecía a *S. cerevisiae*. Por el contrario, a bajas temperaturas ( $10\text{-}15^{\circ}\text{C}$ ) se ve favorecida la persistencia y dominancia de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, hecho también reconocido previamente por otros autores (Fleet y Heard, 1989; Charoenchai et al., 1998; Ciani et al., 2006). Williams et al. (2015) en un reciente estudio sobre la dominancia de especies de levaduras en ambientes con alta cantidad de azúcares encontró que la habilidad de *S. cerevisiae* para dominar la fermentación dependía de varios aspectos, particularmente de la temperatura de fermentación.

#### 2.3.2.1.4. Etanol

El etanol es tóxico para la mayoría de los organismos a concentraciones relativamente bajas, del orden de un 2% (v/v) (Marks et al., 2008), lo que proporciona una idea de su capacidad para alterar procesos biológicos y de la necesidad que tienen las levaduras de desarrollar procesos protectores para sobrevivir a altas concentraciones de etanol. Entre los numerosos efectos del etanol sobre la fisiología de la célula, el más crítico es la reducción de la disponibilidad de agua. Todos los procesos biológicos son dependientes de agua y su ausencia afecta a procesos de vital importancia para la célula como son la actividad enzimática, la formación de proteínas y la estructura de la membrana celular (Hallsworth, 1998).

La respuesta de las levaduras al alto contenido en etanol es similar a la respuesta producida frente al estrés por temperatura, ambas respuestas están dirigidas a reducir los efectos del estrés por agua (Piper, 1997; Hallsworth, 1998). Entre los mecanismos de resistencia a estrés por etanol se pueden citar la síntesis de trealosa y de proteínas antiestrés (Piper, 1997), además se produce un cambio en la composición de la membrana celular con el aumento del grado de saturación de los ácidos grasos de los lípidos de membrana y cambios en el contenido de esteroides (Mannazzu et al., 2008; Navarro Tapia, 2016).

Durante un largo tiempo se ha admitido que *S. cerevisiae* desplazaba a las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica debido a su mayor tolerancia al etanol (Fleet y Heard, 1993; Fleet, 2003). Sin embargo, estudios más recientes llevados a cabo con cultivos puros de levaduras no-*Saccharomyces* muestran algunas de estas levaduras, *H. uvarum*, *Hanseniapore guilliermondii*, *C. zemplinina* y *T.*

*delbrueckii*, pueden soportar niveles de etanol superiores a los establecidos (Pina et al., 2004; Pérez-Nevado et al., 2006).

### 2.3.2.1.5. Oxígeno

El oxígeno es un elemento fundamental en la regulación del metabolismo de azúcares en las levaduras y, es crucial para el crecimiento y la supervivencia de muchas especies de levaduras durante la fermentación (Hansen et al., 2001; Hanl et al., 2005). Durante la fermentación, las levaduras crecen bajo condiciones donde el oxígeno está sólo disponible para las células en muy bajas cantidades. Visser et al. (1990) mostraron que *S. cerevisiae* era capaz de crecer rápidamente bajo condiciones anaerobias estrictas, mientras que otras levaduras pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora* y *Torulaspora* presentaban menor crecimiento bajo las mismas condiciones. Además, en presencia de altas concentraciones de azúcares como es el caso del mosto de uva, *S. cerevisiae* produce etanol aún en condiciones aerobias, lo que es denominado como efecto Crabtree (Fiechter y Seghezzi, 1992). Hoy día es sabido que en levaduras este fenómeno (producción de etanol en presencia de oxígeno) es causado por la limitación de la capacidad respiratoria de las levaduras en crecimiento cuando la glucosa está presente en exceso (Sonnleitner y Käppli, 1986), a consecuencia de la ausencia de control en la asimilación de carbono. Aunque la baja disponibilidad de oxígeno afecta al crecimiento y a la capacidad fermentativa de la mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces* relacionadas con el vino (Hansen et al., 2001; Hanl et al., 2005; Brandam et al., 2013; Jolly et al., 2014), varios autores han demostrado que su muerte temprana durante la fermentación con *S. cerevisiae* no está ligada únicamente a este factor sino también a la competencia por nutrientes como azúcares y nitrógeno o por las interacciones entre las diferentes levaduras (Nissen y Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003; Taillandier et al., 2014).

En la elaboración del vino, es común airear para enriquecer el mosto en oxígeno antes de la fermentación para promover el crecimiento inicial de las levaduras y acelerar la producción de etanol (Boulton et al., 1996). Así, para evitar paradas o ralentizaciones de fermentación, diversos autores han concluido que los mostos requerirían aportes de oxígeno de entre 5 a 10 mg L<sup>-1</sup> durante la fase de crecimiento de las levaduras (Sablayrolles y Barre, 1986; Julien et al., 2000). Este proceso beneficia a aquellas especies de levaduras que son capaces de fermentar en presencia de oxígeno (Crabtree positivas), permitiéndolas dominar la fermentación.

#### 2.3.2.1.6. $SO_2$

En la industria del vino, el dióxido de azufre ( $SO_2$ ) es añadido a las uvas o al mosto para controlar las reacciones de oxidación y restringir el crecimiento de la microbiota nativa (Romano y Suzzi, 1993). La susceptibilidad al  $SO_2$  varía ampliamente entre las especies de levaduras, aunque su uso es altamente tóxico para las levaduras no-*Saccharomyces* mientras que las cepas de *Saccharomyces* muestran mayor resistencia (Fleet, 1992). El efecto antimicrobiano del  $SO_2$  ha sido investigado con métodos cultivo-dependientes (Constantí et al., 1998; Cocolin y Mills, 2003; Takahashi et al., 2014) y con métodos independientes de cultivo, como la PCR cuantitativa (Andorrà et al., 2008), y DGGE (Andorrà et al., 2008; Cocolin y Mills, 2003; Takahashi et al., 2014). Estos estudios confirman que la adición de  $SO_2$  inhibe el crecimiento de ciertos organismos, particularmente levaduras no-*Saccharomyces* y bacterias ácido lácticas (BAL), pero no elimina sus poblaciones completamente.

Las levaduras necesitan una fuente de azufre como dióxido de azufre ( $SO_2$ ) o sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) para sintetizar aminoácidos (metionina o cisteína) a través del proceso de reducción del sulfato. Pero no en todos los mostos la disponibilidad del  $SO_2$  es igual. La proporción de  $SO_2$  molecular es mayor a valores de pH bajos; a pH 3,0, la proporción de  $SO_2$  molecular en solución es diez veces mayor que a pH 4,0 (Boulton et al., 1996). Aunque normalmente la presencia de  $SO_2$  en una fermentación es debido a la adición externa, se ha observado que algunas cepas de *S. cerevisiae* producen entre 25 a 100 ppm de  $SO_2$  (Thornton, 1991). Teniendo en cuenta que la existencia de cepas de levadura capaces de producir altas cantidades de  $SO_2$  es un hecho, es necesario: i) evaluar la cantidad de  $SO_2$  producida durante la fermentación; ii) eliminar los microorganismos con elevada capacidad productora de  $SO_2$  para evitar una modificación no deseada en su concentración en el producto final (Mannazzu et al., 2002).

#### 2.3.2.1.7. pH

El pH del mosto de la uva varía entre 2,8 y 4,0, y es dependiente de varios factores como son el grado de maduración de la uva en el momento de vendimia, la variedad cultivada, la cantidad de cosecha, la estación, la campaña, el contenido de humedad del suelo durante la maduración y la composición mineral disponible para la vid (Boulton et al., 1996). Es importante controlar el pH en el mosto y en el vino ya que afecta a numerosos aspectos a lo largo de la elaboración, como son: la estabilidad microbiológica,

el equilibrio de las sales de tartrato, la efectividad de la adición de SO<sub>2</sub> y de las reacciones enzimáticas, influye en la solubilidad de las proteínas y en la efectividad de la bentonita, afecta al color en vinos tintos y participa en las reacciones de oxidación que determinan el pardeamiento de los vinos (Boulton et al., 1996). Además, a valores de pH próximos a 3,0, el crecimiento y la velocidad de fermentación de *S. cerevisiae* disminuyen (Fugelsang y Edwards, 2007).

### 2.3.2.2. Factores biológicos

La influencia de los factores ambientales citados sobre la sucesión de las levaduras a lo largo del proceso de fermentación está siendo cuestionada y se apunta a otros factores como son las interacciones entre microorganismos, aún no bien estudiados, como posibles responsables de la prevalencia y dominancia de unas especies sobre otras.

#### *2.3.2.2.1. Contactos célula a célula*

La mayoría de los estudios que abordan el contacto celular se refieren a interacciones entre células de mamíferos y bacterias. Estos estudios, encuentran mecanismos de contacto celular mediado por señales que detienen el crecimiento de las células en situación a altas densidades celulares en lugar de inducir la muerte celular (Caveda et al., 1996; Hirano et al., 2001).

Algunos autores han descrito que el tipo de interacción célula a célula está implicado en la muerte temprana de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* (Nissen et al., 2003; Nissen y Arneborg, 2003; Renault et al., 2013). Nissen et al. (2003) y Nissen y Arneborg (2003) mostraron que la muerte de *T. delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans* en cultivo mixto con *S. cerevisiae* no era inducida por etanol ni por algún otro compuesto tóxico, sino que se debía a un mecanismo mediado por el contacto célula a célula. Aunque en un estudio posterior, estos mismos autores concluyeron que el consumo de glucosa y la disponibilidad de oxígeno, eran factores limitantes en el desarrollo de *T. delbrueckii* en cultivo mixto con *S. cerevisiae*, y lo que a su vez producía la muerte temprana de la cepa de no-*Saccharomyces* (Nissen et al., 2004). El estudio realizado por Renault et al. (2013) apoyó nuevamente la conclusión de que la muerte temprana de *T. delbrueckii* era causada por un contacto directo célula a célula.

Recientemente, Kemsawasd et al. (2015) en colaboración con el grupo de Nissen y Arneborg han encontrado que la muerte temprana de *L. thermotolerans* en cultivo mixto con *S. cerevisiae* es debida a un nuevo fenómeno, además del contacto célula a célula, observaron una secreción de péptidos con efecto antimicrobiano que puede estar relacionada con la muerte temprana de *L. thermotolerans*.

El mayor mecanismo conocido de contacto célula a célula es la floculación, definido como la formación de cúmulos de células adheridas que son rápidamente separadas del medio por sedimentación. Una levadura altamente floculante después de la fermentación puede producir sedimentos compactos y facilitar el proceso de clarificación (Govender et al., 2011). Una observación interesante, es que cepas no floculantes pueden adquirir esta capacidad cuando se encuentran en un cultivo mixto (Nishihara et al., 2000). Sosa et al. (2008) demostraron que la levadura floculante *Kloeckera apiculata* interacciona con la levadura no floculante *S. cerevisiae* en fermentaciones mixtas, induciendo la floculación de ambas. En fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae*, *Dekkera* spp., y *K. apiculata* se ha comprobado que co-floculan en presencia de algunas especies de bacterias (Peng et al., 2001). Todos los tipos de floculación parecen estar mediados por un sistema de unión de lectina a carbohidratos en la superficie celular (Nishihara et al., 2000; Peng et al., 2001; Sosa et al., 2008).

#### 2.3.2.2.2. Compuestos con efecto killer

En 1963, Bevan y Makover descubrieron el fenómeno killer en una cepa de *S. cerevisiae* aislada de una cervecera (Bevan y Makover, 1963). El fenotipo killer está basado en la secreción de una proteína de bajo peso molecular o toxina glicoproteica (denominada toxina killer) que elimina a células sensibles del mismo género de levadura o de géneros relacionados, sin contacto directo célula a célula. Las cepas killer son inmunes a su propia toxina, pero serán sensibles a toxinas secretadas por otras levaduras killer (Schmitt y Breinig, 2002).

El fenómeno killer ha sido ampliamente reconocido entre las levaduras vínicas, aunque la relación entre la actividad killer y la temprana desaparición de las levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación no ha sido nunca establecida ya que las toxinas killer producidas por *S. cerevisiae* (K1, K2 y K28) son activas sólo contra cepas de la misma especie (Pérez et al., 2001). Sin embargo, hay evidencias que sugieren la implicación de otras toxinas similares a las killer en las interacciones entre levadura-levadura y levadura-

bacteria en las fermentaciones del vino. Así, varios autores (Comitini et al., 2005; Osborne y Edwards, 2007; Nehme et al., 2010) encontraron que ciertas cepas de *S. cerevisiae* producen compuestos proteínicos que son activos contra bacterias malolácticas. De la misma forma, Albergaria et al. (2010) demostraron que *S. cerevisiae* CCMI 885 produce péptidos (<10 kDa) que inhiben el crecimiento de *H. guilliermondii*, *T. delbrueckii*, *K. marxianus* y *L. thermotolerans*. Estos péptidos antimicrobianos fueron más tarde identificados por Branco et al. (2014) como derivados de la enzima glicolítica, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Recientemente, Taillandier et al. (2014) descartaron que la muerte temprana de *T. delbrueckii* en cultivo mixto con *S. cerevisiae* sea debida a la competencia por sustratos o al contacto célula a célula, sugiriendo que la muerte se induce por unos compuestos desconocidos producidos por *S. cerevisiae*. A su vez, Wang et al. (2015) concluyen en su estudio que la temprana desaparición de *H. uvarum* en el proceso de fermentación, se debe, en parte, a determinados metabolitos liberados al medio por *S. cerevisiae*. Estos mismos autores señalan que la inhibición entre levaduras es especie y cepa específico (Wang et al., 2016).

### 2.3.3. Fermentación espontánea *versus* inoculada

La fermentación espontánea es un proceso biológico realizado por las levaduras presentes en los hollejos de la uva y en el material de bodega. A lo largo del proceso fermentativo tiene lugar la aparición secuencial de diferentes especies de levaduras cuyas características son útiles para preservar las propiedades enológicas de las diferentes regiones productoras de vino (Clemente-Jimenez et al., 2004). La evolución de la fermentación espontánea no siempre es predecible y puede estar sometida a las condiciones climáticas del año de producción, al estado sanitario de la vendimia y a las prácticas de elaboración aplicadas. Como consecuencia de estas condiciones, la microbiota de partida puede ser insuficiente o inadecuada, lo que origina retrasos o paradas en la fermentación, o bien un producto diferente cada añada. Como alternativa, se tiende al control de las condiciones fermentativas. Para ello en la mayoría de las bodegas se utilizan levaduras comerciales seleccionadas en base a buenas capacidades fermentativas y son añadidas externamente al inicio de la fermentación para asegurar una adecuada marcha y finalización de la fermentación, además de, una baja variabilidad entre las diferentes añadas. El objetivo principal de esta práctica es asegurar que la

levadura inoculada se imponga sobre la microbiota natural y tome el control de la fermentación, dando lugar, entre otros aspectos, a procesos de elaboración de vino más cortos.

La práctica de las fermentaciones espontáneas prevaleció en áreas de producción de vino hasta los años 80 por la popular creencia que las cepas de levadura asociadas con el viñedo daban un estilo distintivo y mayor calidad al vino. Así, las levaduras encontradas en la piel de las uvas y la microbiota nativa asociada a las superficies de bodega participan en estas fermentaciones naturales del vino (Ribereau-Gayon et al., 2000). Levaduras de los géneros *Hanseniaspora* y *Candida* predominan en las etapas tempranas, seguidas de varias especies de los géneros *Metschnikowia* y *Pichia* en etapas intermedias cuando el etanol alcanza 3-4% (Torija et al., 2001; Beltran et al., 2002; Xufre et al., 2006). Las etapas tardías de la fermentación espontánea son dominadas por cepas de *S. cerevisiae*, más tolerantes al alcohol y con mayor poder fermentativo. Otras levaduras pertenecientes a especies de los géneros *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, y *Torulaspora* también se han aislado durante la fermentación y en el vino final, siendo algunas de ellas capaces de afectar negativamente a la calidad sensorial del vino.

Sin embargo, la falta de previsibilidad y reproducibilidad de las fermentaciones espontáneas hace que sea más común el empleo de la inoculación controlada de levaduras para la producción de vinos (Pretorius, 2000; Ugliano y Henschke, 2009; Jolly et al., 2014). Numerosas cepas de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* están disponibles comercialmente, y son seleccionadas en base a una serie de criterios, incluyendo su habilidad de hacer distintivo el carácter del vino (Pretorius, 2000; Bisson, 2004). Aunque, las fermentaciones inoculadas se enfrentan también a otro problema y es que se ha reconocido que los vinos elaborados con cultivos iniciadores podrían carecer de complejidad organoléptica y ser demasiado estandarizados y comunes en carácter (Rainieri y Pretorius, 2000; Mannazzu et al., 2002). En respuesta a esas críticas, se están introduciendo nuevas iniciativas como la selección de nuevas cepas y conducir las fermentaciones con cultivos mixtos controlados de diferentes especies de levaduras, con el fin de aumentar el atractivo y la calidad del vino, y sobre todo para dotar de tipicidad a los vinos elaborados en un área concreta.

2.3.4. La importancia de las levaduras no-*Saccharomyces*

El conocimiento de que otros géneros y especies de levaduras, aparte de las especies de *Saccharomyces*, son ecológica y metabólicamente importantes en la fermentación del vino, ha sentado las bases para un uso más creativo y controlado de las levaduras en la producción del vino. En la Tabla 3, se muestran las características positivas y negativas que aportan al vino los principales géneros de levaduras no-*Saccharomyces* con interés enológico.

**Tabla 3.** Principales características enológicas y riesgos de las levaduras no-*Saccharomyces* en vinos (tomado de Capozzi et al., 2015).

Género	Propiedades enológicas	Efecto negativo	Referencias
<i>Torulaspora</i>	Baja concentración de ácido acético	Tasa fermentativa media (7–10% v/v etanol)	Bely et al., 2008; Azzolini et al., 2015
<i>Metschnikowia</i>	Alta concentración de ésteres Incremento del aroma y sabor del vino Actividad antimicrobiana (pulcherrimina)	Retraso en la fermentación debido a la actividad antimicrobiana	Rodríguez et al., 2010; Sadoudi et al., 2012; Oro et al., 2014
<i>Hanseniaspora</i>	Incremento de las cantidades de acetato de 2-feniletilo, alcoholes superiores, acetatos, ésteres de etilo y ácidos grasos de cadena media Reduce el nivel de ocratoxina A	Compuestos negativos (acidez volátil, compuestos del azufre) Producción de aminas biógenas Producción de acetoína Fermentaciones lentas o paradas	Rojas et al., 2003; Angioni et al., 2007; Viana et al., 2009; De Benedictis et al., 2011; Jolly et al., 2014
<i>Candida</i>	Alto productor de glicerol Baja concentración de ácido acético Incremento en la concentración de terpenoles Disminución de la concentración de aldehídos y ésteres de acetato	Producción de compuestos del azufre Baja tasa fermentativa (baja concentración de etanol)	Ciani y Maccarelli, 1998; Sadoudi et al., 2012; Jolly et al., 2014
<i>Lachancea/ Kluyveromyces</i>	Aumento de aroma y sabor Incremento de las concentraciones de ácido láctico, glicerol y 2-feniletanol	Elevado carácter picante y ácido	Kapsopoulou et al., 2007; Cominiti et al., 2011; Gobbi et al., 2013
<i>Issatchenkia</i>	Incremento de la cantidad de monoterpenos libres y norisoprenoides Reducción del contenido en ácido málico	Producción de aminas biógenas	Kim et al., 2008; González-Pombo et al., 2011; Tristezza et al., 2013



Tabla 3 (continuación)

Género	Propiedades enológicas	Efecto negativo	Referencias
<i>Pichia</i>	Incremento de las concentraciones de compuestos volátiles (acetaldehído, acetato de etilo, 1-propanol, n-butanol, 1-hexanol, octanoato de etilo, 2,3-butanediol y glicerol) Incremento de la concentración de polisacáridos	Actividad antimicrobiana contra <i>S. cerevisiae</i>	Clemente-Jiménez et al., 2005; Domizio et al., 2011
<i>Zygosaccharomyces</i>	Baja concentración de ácido acético, H <sub>2</sub> S, SO <sub>2</sub> , degradación de ácido málico, alto poder fermentativo Incremento de la concentración de polisacáridos	Alta cantidad de ácido acético	Domizio et al., 2011; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003
<i>Schizosaccharomyces</i>	Degradación de ácido málico y glucónico	Incremento de la concentración de acetaldehído, propanol y 2,3-butanediol Baja concentración de ésteres	Benito et al., 2014

No obstante, la mayoría de estas levaduras no convencionales no son capaces de completar la fermentación alcohólica, y por ello, se requiere la adición de una cepa de *S. cerevisiae* que asegure el consumo de la totalidad de los azúcares del mosto (Chambers et al., 2015). De esta manera, se ha propuesto el uso de cultivos iniciadores de varias cepas de levaduras, tanto fermentativas como no fermentativas, para asemejar a lo que pasa en una fermentación espontánea, pero de manera controlada. Las diferentes levaduras pueden ser añadidas al mismo tiempo como coinóculo (Soden et al., 2000; Andorrà et al., 2012; Wang et al., 2014); o de manera secuencial, donde cada cepa de levadura es inoculada en diferente momento en la fermentación. Generalmente en primer lugar se añade la cepa no-*Saccharomyces* y se deja fermentar durante un periodo de tiempo determinado, después *S. cerevisiae* es añadida en segundo lugar en la fermentación, para tomar el control del proceso (Zironi et al., 1993; Sun et al., 2014; Benito et al., 2015a).

Estas estrategias de inoculación generan diferentes productos de fermentación. Esto probablemente sea debido a que la co-fermentación implica el intercambio de metabolitos entre las cepas inoculadas, mientras que en la fermentación secuencial sólo la cepa que es añadida en segundo lugar puede modificar la contribución de las cepas que la han precedido (Cherai et al., 2005; Howell et al., 2006). En la práctica, el cultivo secuencial permite que las levaduras no-*Saccharomyces* tengan un mayor efecto en el producto final, mientras que en el cultivo mixto o coinóculo, la cepa no-*Saccharomyces*

es a menudo dominada por especies más competitivas de *Saccharomyces* que acaban imponiéndose y dirigiendo el proceso fermentativo (Soden et al., 2000; Whitener et al., 2017).

Por lo que respecta a los metabolitos secundarios, las levaduras no-*Saccharomyces*, tradicionalmente se han considerado negativas para la calidad del vino. Entre los compuestos no deseables destacan el ácido acético, acetaldehído, acetoína y acetato de etilo, junto con vinil y etil fenoles asociados principalmente al desarrollo del género *Brettanomyces/Dekkera* spp. (Chatonnet et al., 1995). Sin embargo, estudios más profundos han determinado que la producción de algunos de estos compuestos son dependientes de la cepa de levadura (Lambrechts y Pretorius, 2000). Por lo que, la aplicación de criterios de selección adecuados permitiría la identificación de las cepas más favorables para su empleo en el proceso de cultivos mixtos. De este modo, cada vez hay más estudios que ponen de manifiesto el papel positivo de las levaduras no-*Saccharomyces* en las propiedades químicas y sensoriales del vino (Ciani et al., 2010; Domizio et al., 2011; Domizio et al., 2014; Andorrà et al., 2012; Sadoudi et al., 2012; Medina et al., 2013; Gobbi et al., 2013, 2014; Quirós et al., 2014; Contreras et al., 2014; Renault et al., 2015; Benito et al., 2015a).

Entre las propiedades de interés aportadas por las levaduras no-*Saccharomyces* son destacables las que se enumeran a continuación:

- i) Modificación de compuestos específicos, como incremento del contenido en glicerol, aumento de la acidez total, o reducción del contenido de ácido acético del vino.
- ii) Mejora del perfil aromático del vino por la formación o incremento de algunos compuestos del aroma como ésteres o tioles volátiles.
- iii) Reducción del contenido de etanol del vino.
- iv) Control de la microflora contaminante.
- v) Aumento de la calidad global y complejidad del vino.

Entre los avances recientes en la aplicación de las levaduras no convencionales para la elaboración de vino destaca el uso de levaduras nativas o autóctonas adaptadas a las condiciones propias de la zona de producción, lo que permitiría potenciar la identidad

regional de los vinos y la asociación de la biodiversidad de levaduras a su propio *terroir* (Lopes et al., 2002; Torija et al., 2001; Bokulich et al., 2014; Gilbert et al., 2014; Capozzi et al., 2015).

### 2.3.5. Nuevas tendencias de inoculación de levaduras

La reevaluación del papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración del vino ha dado lugar a varios estudios que han analizado el empleo de la especie *S. cerevisiae* junto con especies de levaduras no-*Saccharomyces* para la producción de vino en procesos fermentativos controlados (Lema et al., 1996; Jolly et al., 2003a; Clemente-Jimenez et al., 2005). Esta inclusión de las levaduras no-*Saccharomyces* para mejorar la calidad del vino, se propone como una manera de simular la fermentación espontánea evitando riesgos de paradas en la fermentación o contaminación del vino (Rojas et al., 2003; Romano et al., 2003; Ciani et al., 2006). No obstante, esta práctica implica nuevos retos para los investigadores y enólogos y conlleva la selección de cepas de no-*Saccharomyces* adecuadas, el estudio de las condiciones y momento de inoculación apropiadas, la dosis de levaduras en el cultivo y el seguimiento y control de posibles interacciones entre microorganismos, entre otros aspectos (Padilla et al., 2016).

Las fermentaciones mixtas o secuenciales se utilizan como herramienta biotecnológica para aumentar las características especiales y específicas de un vino y, así mejorar su complejidad debido a que las levaduras no-*Saccharomyces* presentan características enológicas específicas ausentes en especies de *S. cerevisiae* y que pueden tener efectos aditivos en los vinos (Ciani et al., 2010). Por lo que, la aplicación de cultivos mixtos controlados supone un avance en la elaboración tradicional del vino.

Algunos de los ejemplos correspondientes al empleo de combinaciones de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* para la elaboración de vino se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Co-fermentaciones propuestas para la elaboración de vinos, usando levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (adaptado de Ciani et al., 2010).

Especies inoculadas	Objetivo	Proceso	Referencias
<i>S. cerevisiae</i> <i>T. delbrueckii</i>	Reducción de la producción de ácido acético Liberación de polisacáridos	Cultivo secuencial	Bely et al., 2008; Sadoudi et al., 2012; González-Royo et al., 2015
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i>	Degradación de ácido málico	Cultivo secuencial	Benito et al., 2014; Benito et al., 2016
<i>S. cerevisiae</i> <i>H. uvarum</i>	Mejora de la complejidad aromática	Cultivo mixto o secuencial	Moreira et al., 2008; Andorrà et al., 2010a
<i>S. cerevisiae</i> <i>C. stellata</i>	Aumento del contenido en glicerol Mejora del perfil aromático del vino	Cultivo mixto o secuencial	Ciani y Ferraro, 1998; Jolly et al., 2003a; Sadoudi et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i> <i>L. thermotolerans</i>	Reducción de la producción de ácido acético Aumento de la acidez titulable	Cultivo secuencial	Kapsopoulou et al., 2007; Cominiti et al., 2011; Gobbi et al., 2013
<i>S. cerevisiae</i> <i>I. orientalis</i>	Reducción del contenido en ácido málico	Cultivo mixto	Kim et al., 2008
<i>S. cerevisiae</i> <i>P. fermentans</i>	Incremento y mayor complejidad en aroma	Cultivo secuencial	Clemente-Jimenez et al., 2005; Domizio et al., 2011
<i>S. cerevisiae</i> <i>Pichia kluyveri</i>	Incremento de tioles varietales	Cultivo mixto	Anfang et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i> <i>M. pulcherrima</i>	Mejora del perfil aromático del vino Liberación de polisacáridos	Cultivo mixto o secuencial	Jolly et al., 2003b; Rodríguez et al., 2010; González-Royo et al., 2015
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. vanrijae</i>	Incremento en la concentración de geraniol	Cultivo mixto	Garcia et al., 2002
<i>S. cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces</i> spp. <i>Saccharomycodes</i> spp. <i>Pichia</i> spp.	Influencia en las propiedades físico-químicas y sensoriales de los vinos	Envejecimiento sobre lías durante la maduración del vino	Palomero et al., 2009

## 2.4. Técnicas de caracterización y cuantificación de levaduras

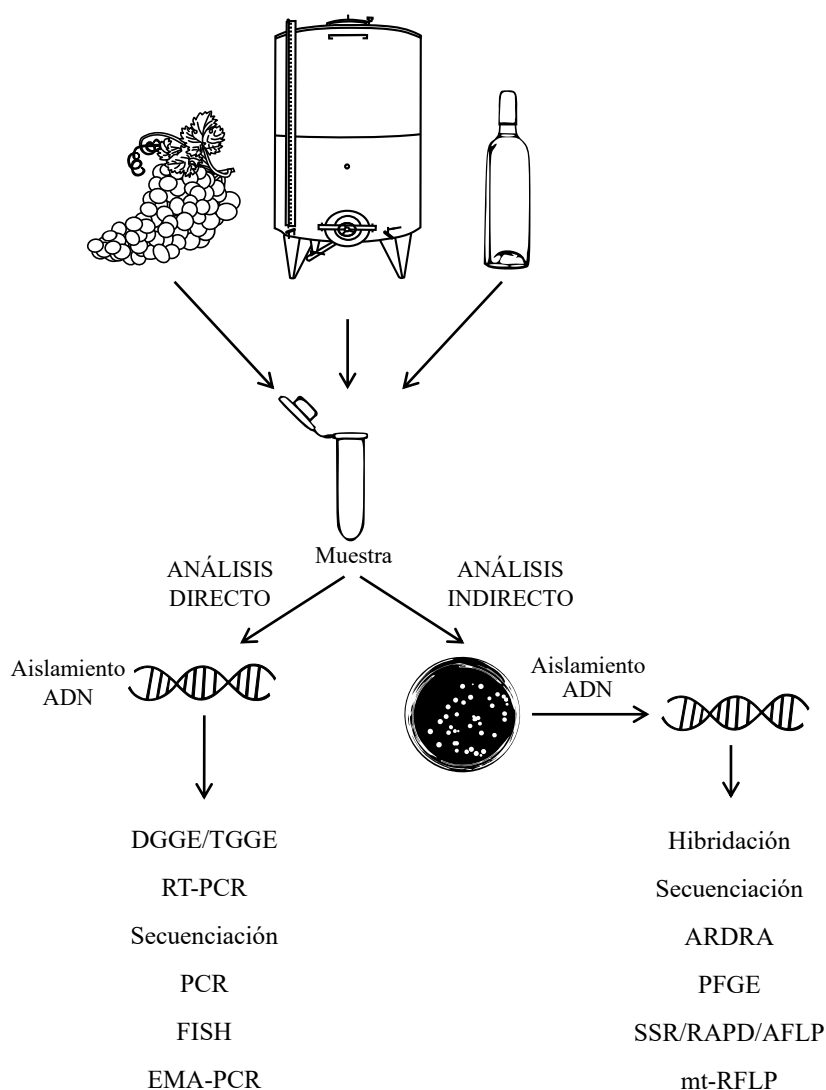
### 2.4.1. Métodos tradicionales *versus* métodos moleculares

La fermentación del vino es un ecosistema microbiano complejo dónde coexisten diferentes especies de levaduras, bacterias y hongos. Tradicionalmente, en la identificación de las levaduras se consideraban criterios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Kreger van Rij, 1984; Barnett et al., 1990; Kurtzmann y Fell, 1998), pero estos métodos permitían discriminar entre especies, siendo imprecisos y de tediosa realización ya que es necesario el aislamiento, cultivo y caracterización de cada especie. Cuando se emplean métodos de enriquecimiento y crecimiento en medios selectivos, la microbiota original presente en la muestra está sujeta a diferentes cambios debido a la capacidad de ciertas especies de dominar el ecosistema (Pace, 1997). Por esta razón, las poblaciones que son numéricamente menos abundantes, o se encuentran bajo condiciones de estrés, son difíciles de recuperar e identificar. Además, las poblaciones minoritarias presentes u organismos viables pero no cultivables son difíciles de detectar usando únicamente medios de cultivo, por lo que es imposible describir la biodiversidad de un ecosistema complejo de manera precisa mediante estos métodos (Cocolin et al., 2013; David et al., 2014; Divol y Lonvaud-Funel, 2005; Quirós et al., 2009; Salma et al., 2013; Wang et al., 2016).

A partir de finales de los años 90, las técnicas moleculares abrieron nuevas fronteras en el entendimiento de la ecología microbiana. Estos métodos pueden ser usados para detectar e identificar microorganismos a lo largo del proceso de elaboración del vino en una o dos fases (Figura 10).

Los métodos moleculares pueden ser aplicados para analizar muestras de diferentes procedencias, desde el viñedo hasta la botella por dos vías diferentes. En una de ellas, denominada análisis molecular indirecto, la muestra es sembrada en un medio de cultivo en placa que permite el crecimiento de los microorganismos, y posteriormente el ADN es aislado a partir de una muestra; ejemplo de este análisis indirecto son las técnicas de hibridación, secuenciación, ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis), SSR (Simple Sequence Repeats), RAPD (Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y mt-RFLP (mitochondrial DNA-Restriction Fragment Length Polymorphism) (Figura 10). En el análisis molecular directo, tanto ADN como ARN se

aíslan directamente de la muestra y son posteriormente analizados aplicando técnicas de identificación y caracterización rápidas que permiten detectar incluso a los microorganismos no cultivables (Ivey y Phister, 2011). Entre las técnicas de análisis directo se encuentran, entre otras, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction), secuenciación, PCR (Polymerase Chain Reaction), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) y EMA-PCR (Ethidium Bromide Monoazide- Polymerase Chain Reaction) (Figura 10).



**Figure 10.** Análisis molecular directo frente a análisis molecular indirecto (adaptado de Ivey y Phister, 2011).

#### 2.4.2. Fenotipo Microarray (PM) para caracterización

La tecnología fenotipo microarray se utiliza para la caracterización fenotípica de levaduras, y está disponible comercialmente a través de Biolog, Inc (Hayward, CA). Consta de un conjunto de placas de 96 pocillos donde cada uno contiene un sustrato, agente estresante, o nutriente diferente (Bochner et al., 2001; Bochner, 2003). Este sistema está basado en el estudio del crecimiento de microorganismos, tanto en cultivo puro como una mezcla de poblaciones (Bochner et al., 2001), y bajo condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (Koutny y Zaoralkova, 2005; Borglin et al., 2009). El crecimiento se evalúa de manera colorimétrica en un lector de placas o en la unidad Omnilog (Biolog, Hayward, CA).

El sistema PM presenta algunas características específicas que no están presentes en los métodos cultivo-dependientes tradicionales que le hace ser útil en diferentes campos de investigación (Denittis et al., 2010). En particular, la evaluación colorimétrica de la actividad metabólica dada como valor de absorbancia tras un cambio de color proporciona:

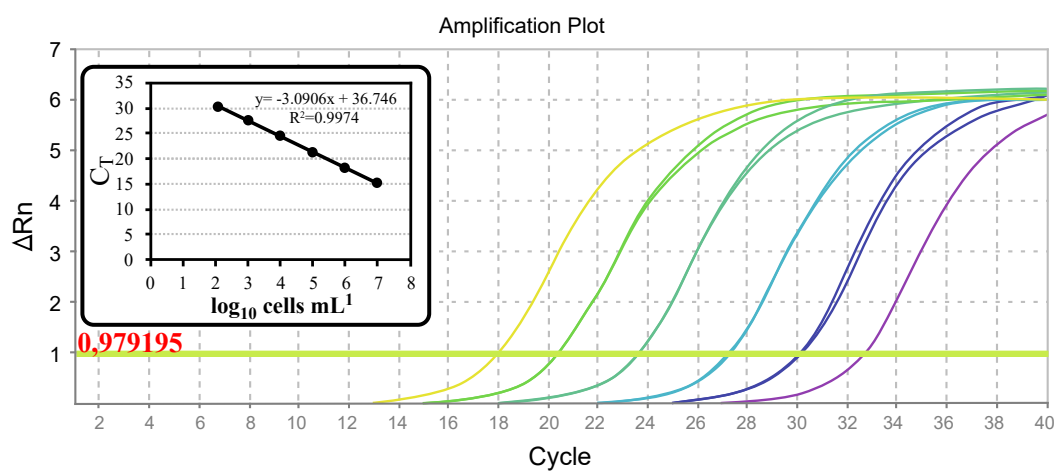
- i) Una rápida indicación de la presencia de microorganismos, sin una gran demora entre las fases de análisis y resultado.
- ii) Una expresión cuantitativa de dicha presencia que puede ser correlacionada con otros parámetros.

Esta tecnología ha sido muy útil para destacar diferencias en las necesidades de crecimiento, utilización de nutrientes, sensibilidad a toxinas, y diversidad genética en bacterias, hongos y células de mamíferos (Greetham, 2014). Ha sido usada para la identificación de levaduras en fermentaciones de vino (Denittis et al., 2010), bacterias procedentes de nichos ambientales (Civilini, 2009; Pinot et al., 2011), y bacterias y levaduras de la superficie de nectarinas (Janisiewicz y Buyer, 2010; Janisiewicz et al., 2010).

#### 2.4.3. PCR cuantitativa (qPCR) para cuantificación

La PCR cuantitativa o también llamada PCR en tiempo real (RT-PCR) fue desarrollada en los años 90 (Wilhelm y Pingoud, 2003). Es una técnica basada en la PCR, pero que incorpora un tinte fluorescente como SYBR Green (o una sonda marcada con un

fluoróforo) donde la fluorescencia va aumentando tras cada ciclo de PCR, debido a que el agente fluoróforo sólo es capaz de ser excitado cuando se encuentra unido a una doble cadena de ADN. La señal de fluorescencia es recogida por un sistema que monitorea la cantidad de fluorescencia emitida en unidades de fluorescencia relativa (RFU). El ciclo de amplificación en el cual la producción de fluorescencia supera el umbral establecido es conocido como el valor umbral del ciclo ( $C_T$ ) (Corless et al., 2000). Esta técnica permite cuantificar la concentración de células en un cultivo por comparación de los valores de  $C_T$  de cada muestra interpolando en una recta patrón elaborada previamente (Figura 11).



**Figura 11.** Gráfico de amplificación de la señal de fluorescencia en las reacciones de PCR cuantitativa y recta patrón.

Debido a la rapidez, la alta especificidad y sensibilidad de esta técnica, ya que tiene un amplio rango de detección, entre  $10^8$  y 1 células por mililitro dependiendo de la especie de levadura (Phister y Mills, 2003), puede ser empleada de manera útil como una herramienta de análisis de rutina en el estudio de microorganismos relacionados con el vino (Hierro et al., 2006; Andorrà et al., 2012). Para una utilización óptima de esta técnica, es necesario un diseño de cebadores apropiado. Para el estudio de levaduras del vino, se dispone de parejas de cebadores diseñadas para diferentes regiones del ADN ribosómico, que incluyen los dominios D1/D2 del gen ADNr 26S (Kurtzman y Robnett, 1998) y la región ITS del gen ADNr 5.8S (James et al., 1996). De este modo, algunos géneros o especies de levaduras relacionadas con el vino han podido ser identificadas y cuantificadas durante la fermentación alcohólica como es el caso de *Zygosaccharomyces bailii* (Rawsthorne y Phister, 2006; Andorrà et al., 2010b), *Zygosaccharomyces florentinus* (Díaz et al., 2013), *Hanseniaspora* spp. (Hierro et al., 2007; Zott et al., 2010), *Hanseniaspora uvarum* (Zott et al., 2010; Díaz et al., 2013), *S. cerevisiae* (Martorell et



al., 2005; Hierro et al., 2006; Salinas et al., 2009; Díaz et al., 2013), *Starmerella bacillaris* (Andorrà et al., 2010b; Zott et al., 2010), *Metschnikowia pulcherrima* (Zott et al., 2010; Díaz et al., 2013), *Torulaspora delbrueckii* (Zott et al., 2010; Díaz et al., 2013), *Pichia kluyveri* (Díaz et al., 2013), *Wickerhamomyces anomalus* (Díaz et al., 2013), *Rhodotorula mucilaginosa* (Díaz et al., 2013) y *Brettanomyces bruxellensis* (Phister y Mills, 2003; Tessonnière et al., 2009; Willenburg y Divol, 2012).

#### 2.4.4. PCR-SSR o de microsatélites para caracterización de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*

Este método está basado en el estudio del polimorfismo en longitud de secuencias repetidas simples dispersas a lo largo del genoma completo, secuencias denominadas microsatélites (Fernández-Espinar et al., 2006). El análisis de microsatélites ha sido exitosamente empleado para la discriminación de cepas de *S. cerevisiae* (González Techera et al., 2001; Hennequin et al., 2001; Vaudano y Garcia-Moruno, 2008; Tello et al., 2012). También, este método ha permitido la diferenciación de un gran número de cepas de levaduras comerciales (Schuller et al., 2004; Legras et al., 2005; Bradbury et al., 2006). Este poder de discriminación, combinado con su robustez y aplicabilidad sobre el DNA molde (Howell et al., 2004) han permitido que el método de PCR microsatélites sea uno de los más empleados en la discriminación a nivel de cepa.

El inconveniente en la aplicación rutinaria de este método puede ser durante el análisis del amplicón, ya que el uso de geles de poliacrilamida y del secuenciador para determinar el tamaño de amplicón es costoso y largo. Para salvar esta limitación, se recurre a la electroforesis simple en geles con alta concentración de agarosa (Routman y Cheverud, 1994; Ferraro et al., 1998).

### 2.5. Metabolitos de interés en el vino

Las levaduras utilizan los compuestos del mosto como sustrato para su crecimiento, generando así productos metabólicos que son liberados al vino (Boulton et al., 1996). Siendo los más abundantes el dióxido de carbono y etanol y, en menor cantidad, glicerol y ácido succínico. Además de estos compuestos mayoritarios, se producen en pequeñas cantidades cientos de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, y contribuyen de manera colectiva a la calidad del vino (Fleet, 2007). La producción de estos metabolitos varía considerablemente dependiendo de la especie, la

cepa de levadura y de las condiciones de fermentación (Heard, 1999; Romano et al., 2003). Entre estas sustancias destacan un amplio rango de ácidos orgánicos, alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, compuestos del azufre, y aminas. La identidad química de las sustancias, su sabor y aroma, sus límites de percepción y su concentración en vinos están bien documentados (Ferreira et al., 2000; Cole y Noble, 2003; Francis y Newton, 2005), y la bioquímica de su formación es bien conocida en *S. cerevisiae* (Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005), al menos. En el caso de las levaduras no-*Saccharomyces*, numerosos estudios están siendo realizados en los últimos años para conocer las características metabólicas de estas levaduras.

### 2.5.1. El aroma en el vino

Entre los muchos factores que contribuyen a la tipicidad y calidad del vino, el aroma es probablemente la característica organoléptica más importante y un atributo clave para el consumidor (Perestrelo et al., 2006). El aroma del vino posee una gran complejidad, determinada por el elevado número de diferentes compuestos volátiles que lo constituyen, cuyas concentraciones van desde algunos nanogramos a miligramos por litro (Castro et al., 2004) y, también determinada por su origen que es resultado de una secuencia biológica, bioquímica y tecnológica.

Hay que tener en cuenta que no todos los compuestos volátiles contribuyen de igual forma al aroma final del vino. La percepción olfativa umbral para cada compuesto varía considerablemente; el impacto olfativo de un compuesto dependerá de si está presente a concentraciones por encima de su umbral correspondiente (Guth, 1997; Ferreira et al., 2000). Aunque algunos aromas son debidos a un solo compuesto como es el caso del olor a plátano del acetato de isoamilo; en otros casos, el aroma es debido a la acción sinérgica de un compuesto principal junto a otros que lo potencian o lo enmascaran, de manera que el umbral de percepción se ve modificado en su conjunto (Atienza et al., 1999).

#### 2.5.1.1. Clasificación de aromas

Atendiendo al origen de los compuestos que lo forman, el perfil aromático del vino se divide en tres componentes: aroma varietal o primario, aroma fermentativo o secundario y aroma derivado de la crianza o terciario (Weldegergis et al., 2011).

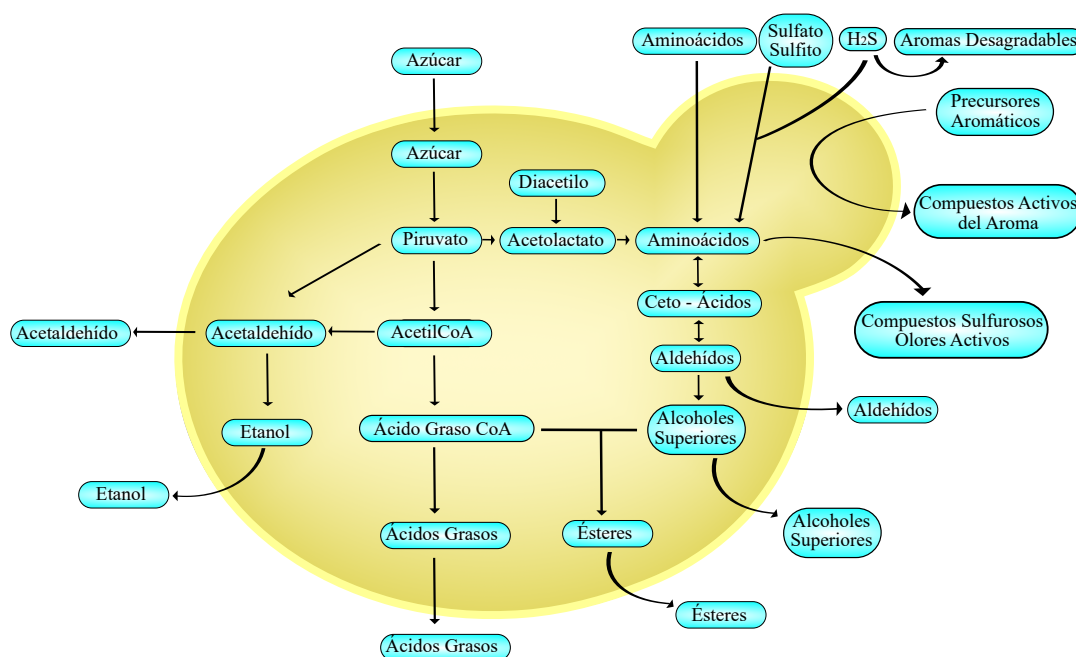
El aroma varietal o primario está formado por compuestos complejos que provienen directamente de las uvas en donde se encuentran, bien en estado libre, o combinados en forma de moléculas no volátiles. Éstas últimas, denominadas precursores aromáticos, por acción de las enzimas y de la acidez del vino se hidrolizan, y se liberan las moléculas volátiles que percibimos (Cacho, 2003). Su importancia radica en que son característicos de cada variedad, lo que les permite diferenciar y clasificar distintos vinos varietales. A este grupo pertenecen principalmente los compuestos terpénicos, norisoprenoides, ácidos benzoicos y fenoles y derivados de la cisteína.

El aroma fermentativo o secundario es el que se atribuye a los compuestos generados durante la fermentación alcohólica por el metabolismo de las levaduras o por las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica (Lambrechts y Pretorius, 2000; Knoll et al., 2012). Dentro del grupo de los aromas fermentativos, se engloban, principalmente, a los alcoholes, los ésteres y los ácidos grasos.

El aroma terciario también denominado “bouquet”, aparece como consecuencia de una serie de reacciones físico-químicas y enzimáticas que tienen lugar en el proceso de envejecimiento del vino. Se distinguen dos tipos de envejecimiento, el de oxidación, originado por la crianza en madera y, el de reducción, generado durante el envejecimiento en botella (Rapp y Mandery, 1986). Durante este periodo, en general, desaparece parte del aroma afrutado evolucionando a un aroma más complejo. En bodega, el vino adquiere aromas de la madera, produciéndose un aumento de notas a especias, madera y vainilla reduciéndose los aromas primario y secundario. Algunos de los compuestos procedentes de la bodega son whiskylactonas, vainillina y algunos fenoles volátiles. En botella se produce una disminución de ésteres y monoterpenos lo que disminuye el carácter frutal y varietal, algunos de los compuestos que se forman son los norisoprenoides como el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) y la damascenona, y algunos compuestos azufrados como el disulfuro de metilo (Balboa-Lagunero et al., 2011).

#### 2.5.1.2. Compuestos volátiles producidos en la fermentación

El papel principal de las levaduras del vino es catalizar la conversión rápida, completa y eficiente de los azúcares de la uva en etanol, dióxido de carbono y otros compuestos minoritarios, pero sensorialmente importantes, sin producir aromas desagradables (Figura 12) (Pretorius, 2000). Un papel secundario, pero no menos importante, implica la liberación de precursores aromáticos derivados de las uvas

[illegible]

**Figura 12.** Formación de compuestos aromáticos durante la fermentación alcohólica  
(adaptado de Swiegers et al. 2005)

#### 2.5.1.2.1. Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores son metabolitos secundarios producidos principalmente por el metabolismo secundario de las levaduras y pueden tener un impacto positivo o negativo sobre el aroma del vino. Concentraciones excesivas de alcoholes superiores que sobrepasen los 400 mg L<sup>-1</sup>, pueden dar resultado a olores fuertes y acres, mientras que a niveles óptimos por debajo de 300 mg L<sup>-1</sup>, imparten carácter afrutado (Rapp y Versini, 1995; Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005). Estos alcoholes superiores, en la Tabla 5 se detallan los principales, están divididos en dos categorías, alcoholes

alifáticos y aromáticos, y son los más importantes en vinos y destilados (Nykanen et al., 1977). Los alcoholes alifáticos incluyen el propanol, alcohol isoamílico, isobutanol y hexanol. Los alcoholes aromáticos están constituidos principalmente por el 2-feniletanol y el tirosol. El 2-feniletanol se considera que siempre aporta características positivas, debido a su agradable aroma a rosas (Swiegers et al., 2005).

**Tabla 5.** Umbral de detección y descripción aromática, según las referencias mostradas, de algunos de los alcoholes superiores producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica.

Alcohol superior	Umbral de detección (mg L <sup>-1</sup> )	Descripción aromática	Referencia
Propanol	9	Alcohol, fruta madura	Peinado et al., 2004
Alcohol isoamílico	30	Áspero, amargo	Guth, 1997
Isobutanol	40	Alcohol, disolvente	Ferreira et al., 2000
Hexanol	8	Herbáceo	Ferreira et al., 2000
2-Feniletanol	14	Floral, rosas	Ferreira et al., 2000
Tirosol	No determinado	Miel	Lambrechts y Pretorius, 2000

El uso de diferentes cepas de levadura durante la fermentación contribuye considerablemente a variaciones en los perfiles de alcoholes superiores y sus concentraciones en el vino (Giudici et al., 1990). Las levaduras no-*Saccharomyces* pueden modificar los niveles de alcoholes superiores. Hay estudios que afirman que las levaduras no-*Saccharomyces* a menudo forman bajos niveles de estos alcoholes, aunque muestran gran variabilidad entre cepas (Romano et al., 1992; Zironi et al., 1993). En cambio, Clemente-Jimenez et al. (2005) observaron que *P. fermentans* en cultivo mixto con *S. cerevisiae* produce un sustancial aumento en alcoholes superiores como 1-propanol, n-butanol, 1-hexanol en comparación con el cultivo puro de *S. cerevisiae*. También, cepas de *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* han destacado por una alta producción de 2-feniletanol en fermentaciones con *S. cerevisiae* (Cominiti et al., 2011; Gobbi et al., 2013; Benito et al., 2015b).

Por otra parte, la concentración de aminoácidos (precursores de los alcoholes superiores) en el mosto influye en su producción, por lo que a mayor concentración de

aminoácidos se produce un incremento en el contenido de alcoholes superiores en el vino (Schulthess y Ettlinger, 1978). Además, la concentración de etanol, la temperatura de fermentación, el pH y la composición del mosto, la aireación, la variedad de uva, madurez y tiempo de contacto con la piel de la uva también afectan en la concentración de alcoholes superiores en el producto final (Fleet y Heard, 1993).

### 2.5.1.2.2. Ésteres

Los ésteres producidos por las levaduras durante la fermentación contribuyen al aroma agradable en los vinos, los más importantes de ellos presentan de manera individual aromas frutales o florales (Tabla 6). Los ésteres presentes en el vino se encuentran, normalmente, a concentraciones superiores a sus umbrales de percepción y constituyen el grupo de compuestos aromáticos más importante, con más de 160 ésteres descritos en el vino (Jackson, 2000). Atendiendo a las características que aportan al vino se clasifican en dos grupos, ésteres polares y ésteres apolares (Baumes et al., 1986). Dentro de los ésteres polares, los más importantes en el vino son lactato de etilo, succinato de dietilo, etil-4-hidroxibutanoato y malato de etilo, que proporcionan cuerpo al vino. Entre los ésteres apolares, se incluyen los ésteres de acetato de alcoholes superiores formados por el acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de hexilo y acetato de 2-feniletilo; y los ésteres de ácidos grasos formados por el butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo. En general, los ésteres apolares se asocian al aroma frutal, floral y fresco de los vinos jóvenes. El acetato de etilo es el principal éster presente en el vino y puede proporcionar aromas desagradables en éste, con notas a barniz o pegamento cuando los valores alcanzan los 170 mg L<sup>-1</sup> en vinos blancos y 160 mg L<sup>-1</sup> en vinos tintos (Corison et al., 1979). Las levaduras apiculadas, como *K. apiculata*, han sido descritas como grandes productoras de acetato de etilo, lo que hace que su presencia durante la fermentación se relacione con la producción de vinos de baja calidad (Romano et al., 1992).

Muchos son los factores que pueden influir en la producción de ésteres durante la elaboración del vino, el grado de madurez y el contenido de azúcar de la uva (Houtman et al., 1980), la temperatura de fermentación (Piendl y Gieger, 1980), el método de vinificación empleado (Gómez et al., 1994), la variedad de uva, el proceso de envejecimiento y la temperatura y tipo de almacenamiento (Marais y Pool, 1980). Pero un factor de vital importancia y que tiene gran influencia en la composición aromática de los

vinos es la cepa o cepa de levaduras conductoras de la fermentación alcohólica (Lambrechts y Pretorius, 2000).

El empleo de cultivos mixtos de *H. guilliermondii* y *W. anomalus* junto con *S. cerevisiae* muestran un incremento de las concentraciones de ésteres de acetato en comparación con el cultivo puro de *S. cerevisiae*, sin afectar de manera significativa a las cantidades de acetaldehído, ácido acético, glicerol y alcoholes superiores (Rojas et al., 2003). *M. pulcherrima* también es conocida por producir altas concentraciones de ésteres, especialmente octanoato de etilo, relacionado con el aroma a pera (Clemente-Jimenez et al., 2004; Sadoudi et al., 2012). También se ha descrito una mayor producción de propanoato de etilo, isobutirato de etilo y acetato de isobutilo en fermentaciones mixtas con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*, y estos compuestos fueron relacionados con el aroma afrutado y la mayor complejidad presentes en el vino final (Renault et al., 2015).

**Tabla 6.** Umbral de detección y descripción aromática, según las referencias mostradas, de los principales ésteres producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica.

Éster	Umbral de detección (mg L <sup>-1</sup> )	Descripción aromática	Referencia
Acetato de etilo	7,5	Barniz, afrutado	Guth, 1997
Acetato de isoamilo	0,03	Plátano	Ferreira et al., 2000
Acetato de hexilo	1	Pera, afrutado	Chaves et al., 2007
Acetato de 2-feniletilo	0,25	Floral, lilas	Guth, 1997
Butirato de etilo	0,02	Frutal, manzana	Ferreira et al., 2000
Hexanoato de etilo	0,014	Piña, manzana	Ferreira et al., 2000
Octanoato de etilo	0,58	Piña, floral	Etiévant, 1991
Decanoato de etilo	0,2	Floral	Ferreira et al., 2000
Isovalerato de etilo	0,003	Fruta dulce, plátano	Ferreira et al., 2000

## 2.5.1.2.3. Ácidos grasos

El vino contiene una mezcla de ácidos grasos de cadena corta ( $C_2$ - $C_5$ ), de cadena media ( $C_6$ - $C_{10}$ ) y de cadena larga ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ) que aportan notas frutales, aromas de queso, grasos y notas rancias. Entre los ácidos  $C_6$ - $C_{10}$  en el vino se encuentran el ácido hexanoico, el ácido octanoico y el ácido decanoico, y aunque su presencia está relacionada normalmente con la presencia de aromas desagradables, son muy importantes en el equilibrio aromático en los vinos ya que su esterificación genera sus ésteres correspondientes (Edwards et al., 1990) que proporcionan aromas agradables. Shinohara (1985) encontró que concentraciones de 4 a 10 mg L<sup>-1</sup> de ácidos grasos de cadena media  $C_6$ - $C_{10}$  aportan un aroma suave y agradable a los vinos, en cambio cantidades superiores a 20 mg L<sup>-1</sup> tienen un efecto negativo. En la Tabla 7 se representan algunos de los ácidos grasos volátiles producidos por las levaduras, sus umbrales de percepción y la descripción del aroma en vino.

**Tabla 7.** Umbral de detección y descripción aromática, según las referencias mostradas, de algunos de los ácidos grasos volátiles producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica.

Ácido graso	Umbral de detección (mg L <sup>-1</sup> )	Descripción aromática	Referencia
Ácido isobutírico	0,23	Rancio, mantequilla, queso	Ferreira et al., 2002
Ácido butírico	0,173	Queso, mantequilla	Ferreira et al., 2000
Ácido isovaleriánico	0,033	Queso	Ferreira et al., 2000
Ácido hexanoico	0,42	Queso, verde	Ferreira et al., 2000
Ácido octanoico	0,5	Queso, fruta ácida	Ferreira et al., 2000
Ácido decanoico	1	Rancio, graso	Ferreira et al., 2000

## 2.5.2. Polisacáridos y oligosacáridos en el vino

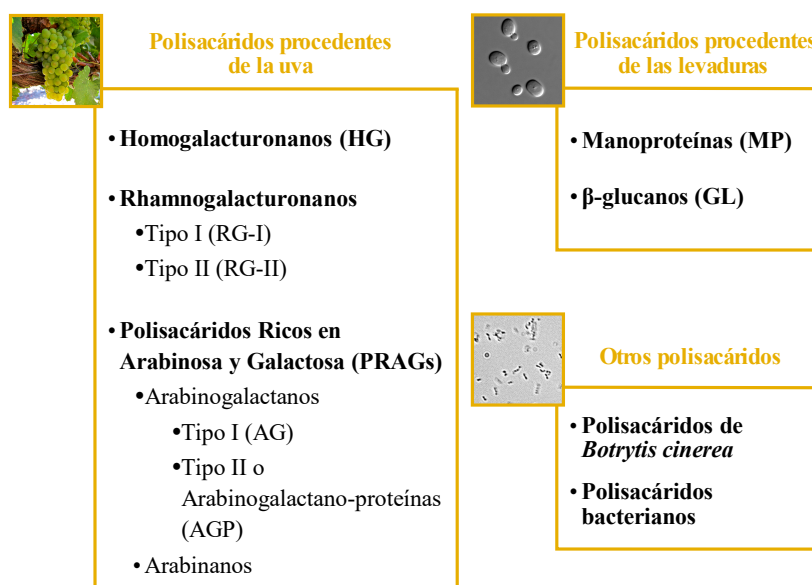
Los carbohidratos complejos están presentes en el vino, y junto con los polifenoles y las proteínas, constituyen las macromoléculas del vino. Los oligosacáridos y polisacáridos muestran una alta especificidad estructural, tanto como las proteínas o polinucleótidos, y una estructura y función compleja. Estos compuestos juegan un papel



fundamental por su efecto sobre la estabilidad coloidal de los vinos y, por tanto, son importantes tanto en las diferentes etapas del proceso de vinificación como en las propiedades organolépticas del vino final (Guadalupe et al., 2015). Tanto la estructura como la cantidad de polisacáridos y oligosacáridos presentes en el vino varían dependiendo de determinados factores como la variedad de uva, el proceso de elaboración del vino, la utilización de enzimas y la cepa de levadura empleada (Doco et al., 2007; Apolinar-Valiente et al., 2014a; Domizio et al., 2011; Giovani et al., 2012; Kulkarni et al., 2015; González-Royo et al., 2015).

### 2.5.2.1. Polisacáridos

Los polisacáridos han sido ampliamente estudiados debido a sus importantes propiedades tecnológicas y sensoriales en vinos. Estas macromoléculas tienen la capacidad de interactuar y formar agregados con taninos (Poncet-Legrand et al., 2007), disminuyen la astringencia (Vidal et al., 2004), inhiben la cristalización de tartratos ácidos (Gerbaud et al., 1996), interactúan con compuestos aromáticos del vino (Chalier et al., 2007), forman complejos de coordinación específicos con iones  $Pb^{+2}$  (Pellerin et al., 1997) y previenen o evitan formación de agregados proteicos en vinos blancos (Lomolino y Curioni, 2007; Dufrechou et al., 2015).



**Figura 13.** Clasificación de los principales grupos de polisacáridos según su origen.

Este grupo de macromoléculas proceden tanto de las paredes celulares de la uva como de las levaduras u otros microorganismos presentes en el proceso de elaboración (Figura 13). Desde el punto de vista cuantitativo, los polisacáridos procedentes de la uva y de las levaduras son los más importantes.

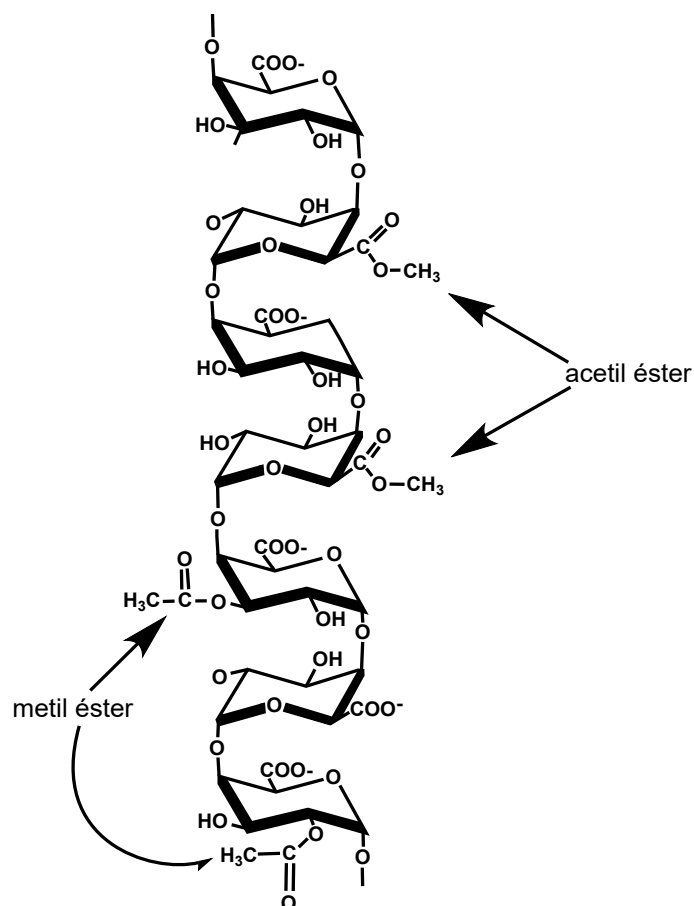
### *2.5.2.1.1. Polisacáridos procedentes de la uva*

Los polisacáridos de la uva provienen de la degradación y solubilización de las sustancias pécticas presentes en el hollejo y en la pulpa de las uvas, gracias a la acción de diversas enzimas pectolíticas endógenas o exógenas, y se liberan en las primeras etapas de la vinificación (Doco et al., 1996; Vidal et al., 2000). El contenido en polisacáridos procedentes de la uva en el vino dependerá del grado de maduración de ésta, de las técnicas empleadas en el proceso de vinificación como la maceración prolongada y de la adición de enzimas exógenas. Estas macromoléculas se clasifican en sustancias pécticas neutras o pécticas ácidas, dependiendo de la presencia o ausencia de ácido galacturónico en la molécula. De esta forma, homogalacturonanos y ramnogalacturonanos se engloban dentro de las sustancias pécticas ácidas, mientras que los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) se clasifican como sustancias pécticas neutras.

Los homogalacturonanos (HG) son los polisacáridos más abundantes de la uva ya que constituyen el 80% de los polisacáridos pécticos de las paredes celulares de la pulpa y de hollejos (Vidal et al., 2001). Consisten en un esqueleto de ácido galacturónico unido en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), esterificado parcialmente con metanol y/o ácido acético (Ochoa-Villarreal et al., 2012) (Figura 14). A pesar de ser abundantes en mostos, la cantidad en vinos blancos y tintos es baja, debido a la acción de las enzimas poligalacturonasas procedentes de la uva o de la levadura durante la fermentación (Vidal et al., 2001; Pellerin y Cabanis, 2003).

Los ramnogalacturonanos tipo I (RG-I) son los polisacáridos pécticos encontrados en el vino en menor cantidad, aunque su concentración en la uva es relativamente alta (15%), lo que se debe posiblemente bien a su degradación por parte de las glucanasas presentes en el proceso de fermentación, o bien a la solubilización incompleta de RG-I procedente de las paredes celulares de la uva (Vidal et al., 2001). La estructura de los RG-I está formada por un esqueleto de repeticiones del disacárido formado por ácido galacturónico y ramnosa al que se unen arabinanos, galactanos y arabinogalactanos

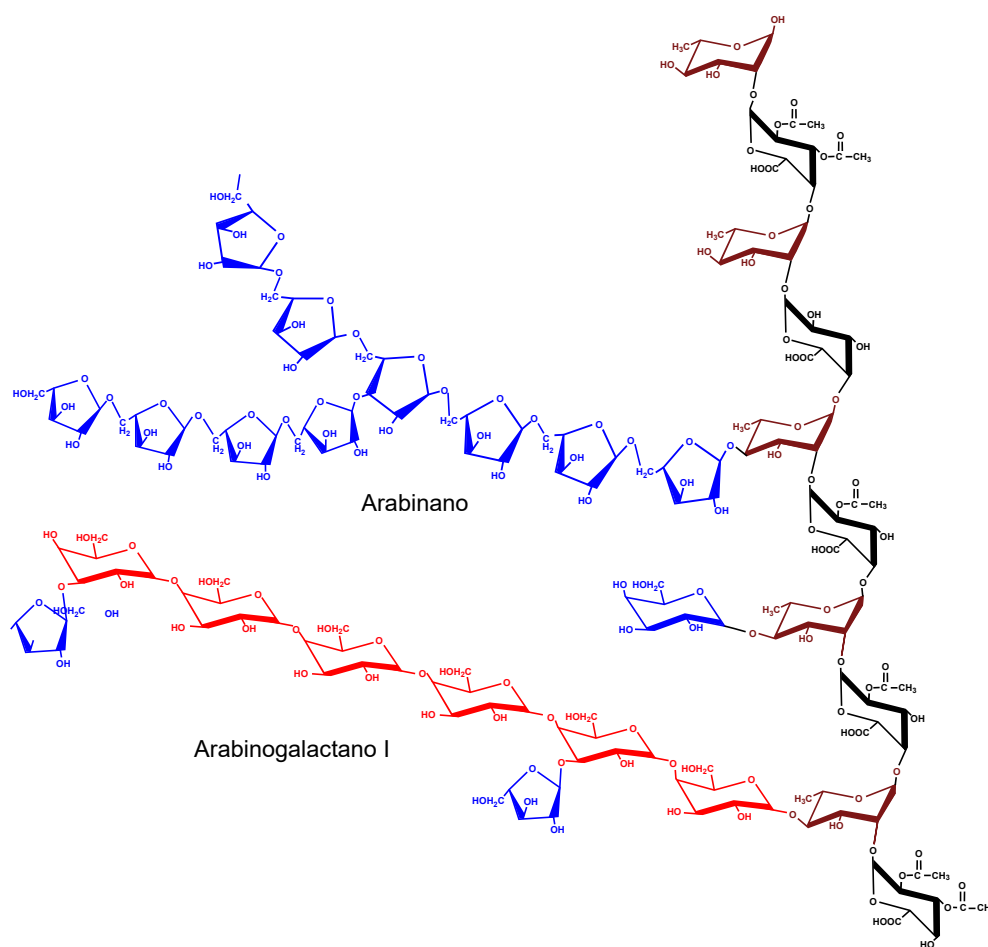
altamente ramificados unidos a los residuos de L-ramnosil, dando forma a una amplia red de pectina (Ochoa-Villarreal et al., 2012) (Figura 15). Del mismo modo, de los arabinanos y arabinogalactanos de tipo I (AG) sólo aparecen restos hidrolizados en los turbios del vino.



**Figura 14.** Estructura de homogalacturonanos. Es un polímero lineal de ácido  $\alpha$ -(1,4)-D galacturónico esterificado por grupos metilo en C-6 y por grupos acetilo en posiciones O-2 y/o O-3 (tomado de Ochoa-Villareal et al., 2012).

El ramnogalacturonano tipo II (RG-II) posee una estructura muy compleja, una masa molecular pequeña de 5 KDa y representa menos del 5% de los polisacáridos de las paredes celulares de las uvas. Su estructura química, similar en todos los vegetales, está formada por un esqueleto central de unidades de ácido galacturónico, unido a su vez a cuatro cadenas laterales de oligosacáridos que contienen ramnosa, arabinosa, fucosa, galactosa y los ácidos glucurónico y galacturónico, además de azúcares raros (2-O-metil-fucosa, apiosa, 2-O-metil-xilosa, Kdo o 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico, Dha o 3-deoxi-D-*liso*-2-heptulosónico, ácido acérico o ácido 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilosa)

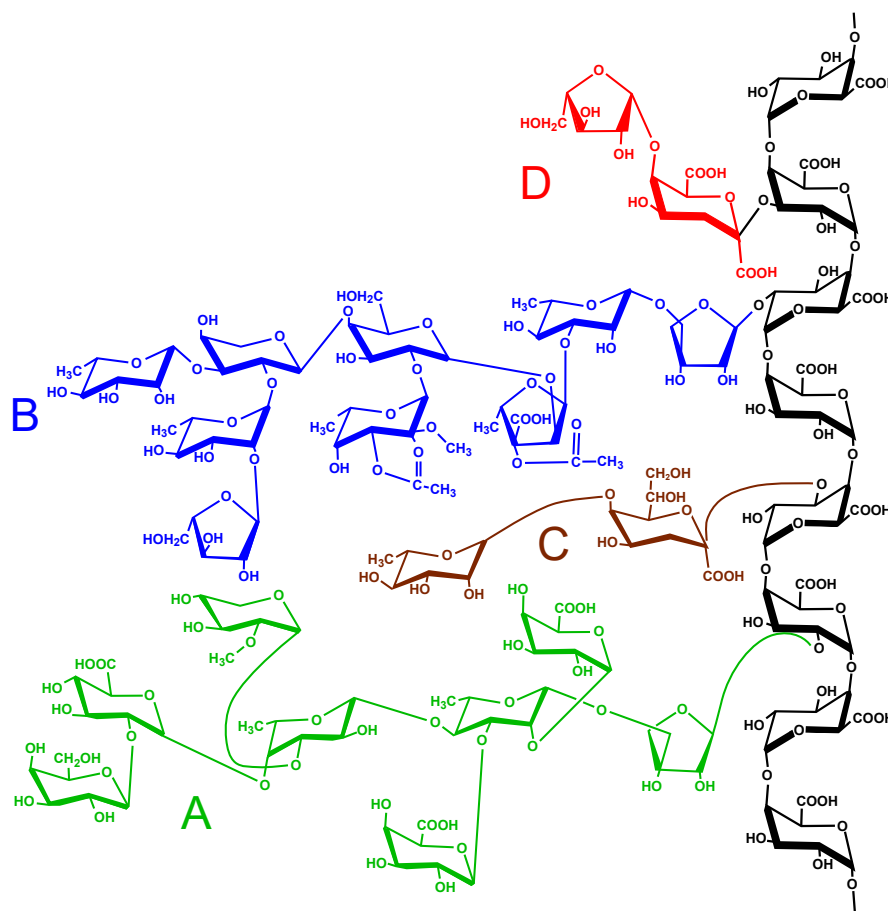
exclusivos de la molécula RG-II, por lo se usan para su cuantificación e identificación (Doco y Brillouet, 1993; Pellerin et al., 1996; Vidal et al., 2003) (Figura 16). En la uva, los RG-II son más abundantes en los hollejos que en la pulpa (Vidal et al., 2001), por lo que las concentraciones en vino tinto ( $100\text{-}150\text{ mg L}^{-1}$ ) son más elevadas que en blanco ( $30\text{-}50\text{ mg L}^{-1}$ ). Su valor permanece estable durante el proceso de elaboración del vino hasta la etapa de envejecimiento en botella (Guadalupe y Ayestarán, 2007).



**Figura 15.** Principales características estructurales del ramnogalacturonano tipo I (RH-I).

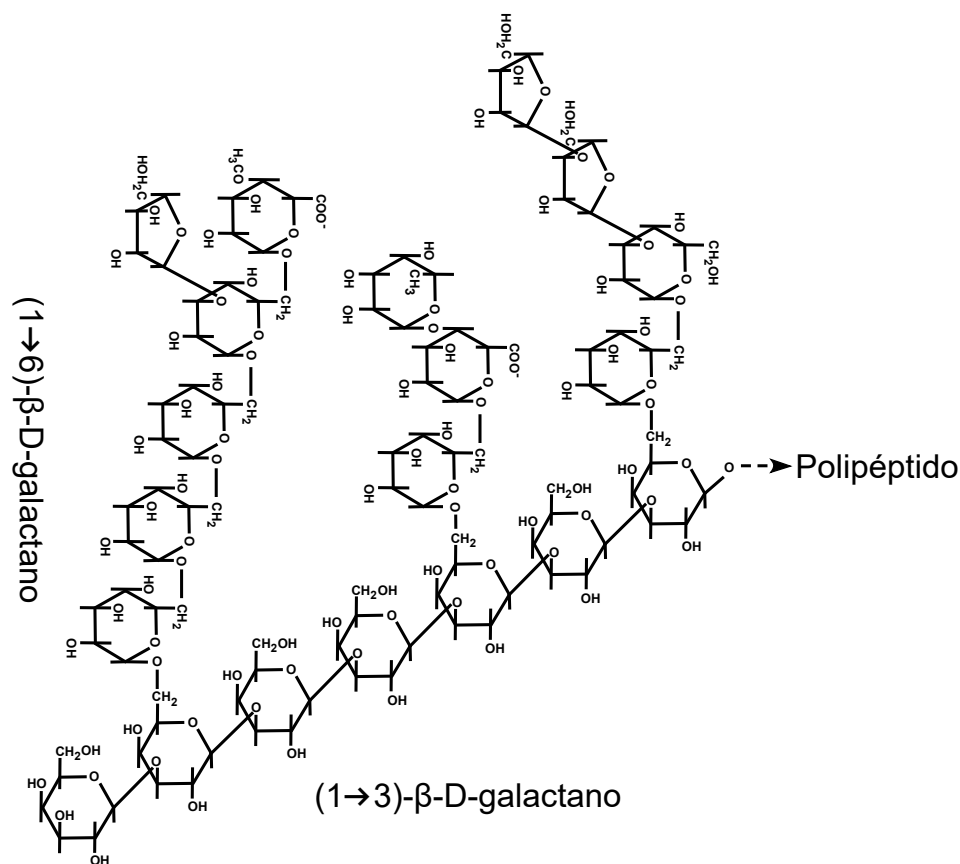
La parte central está formada por un disacárido de repeticiones de la unidad ácido  $\alpha$ -(1,4)-

D-galacturónico- $\alpha$ -(1,4)-L-ramnosa. Las ramificaciones de oligosacáridos están compuestas predominantemente de  $\alpha$ -L-arabinosa (en azul) y/o residuos de  $\beta$ -D-galactosa (en rojo) (tomado de Ochoa-Villareal et al., 2012).



**Figura 16.** Estructura del ramnolacturonano tipo II (RG-II). El esqueleto de la molécula de RG-II está compuesto por residuos de ácido  $\alpha$ -(1,4)-D galacturónico. Cuatro cadenas externas de oligosacáridos de diferente estructura unidas a RG-II se representan en diferentes colores (A-D) (tomado de Ochoa-Villareal et al., 2012).

Los arabinogalactanos tipo II o arabinogalactan-proteínas (AGP) son el grupo más abundante de polisacáridos en mostos y vinos. Son extraídos fácilmente durante el proceso de prensado y la elaboración del vino (Vidal et al., 2000; Doco et al., 2007; Ducasse et al., 2010a), encontrándose en mayor cantidad en la pulpa que en los hollejos (Vidal et al., 2001). Su estructura consiste en un esqueleto central con residuos de  $\beta$ -D-galactano unidos en posición 1 $\rightarrow$ 3, de dónde se ramifican cadenas cortas de  $\beta$ -D-galactano en enlace 1 $\rightarrow$ 6. Estas cadenas se encuentran normalmente saturadas con residuos de arabinosa y otros azúcares como xilosa, ramnosa, fucosa y ácido glucurónico (Figura 17). Su contenido en vinos tintos es de 100-200 mg L<sup>-1</sup> y en blancos de 50-100 mg L<sup>-1</sup> (Pellerin and Cabanis, 2003); estas cantidades se ven afectadas en los vinos por crianzas de larga duración (Doco et al., 1999) o la por crianza sobre lías (Doco et al., 2003).



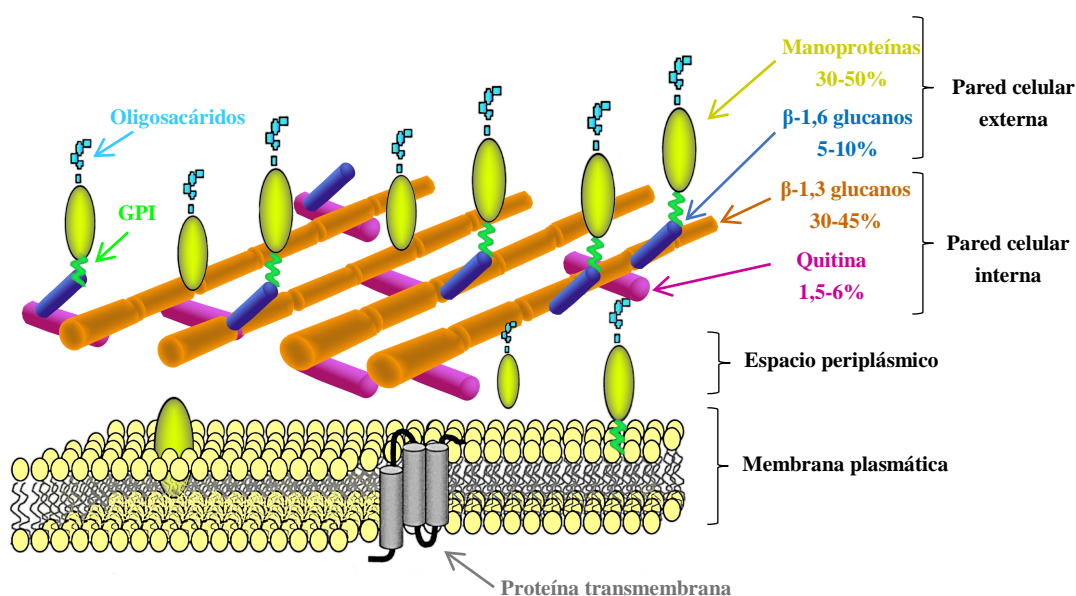
**Figura 17.** Estructura de arabinogalactan-proteínas (AGPs) (adaptado de Nothnagel et al., 2000).

Los AGPs han presentado interesantes propiedades físico-químicas en el vino, poseen efecto inhibitor sobre la formación de enturbiamientos proteicos (Waters et al., 1993), reducen la agregación de taninos (Riou et al., 2002) y aportan cuerpo al vino, ya que la combinación de AGP más manoproteínas reduce significativamente la sensación de sequedad (Vidal et al., 2004).

Actualmente, los arabinanos, arabinogalactanos tipo I y los AGP son englobados dentro de un mismo grupo denominado PRAGs (Polisacáridos Ricos en Arabinosa y Galactosa) (Doco et al., 2007; Ducasse et al., 2010b; Quijada-Morín et al., 2014; Apolinar-Valiente et al., 2014b).

### 2.5.2.1.2. Polisacáridos procedentes de las levaduras

Los polisacáridos procedentes de las levaduras tienen su origen en su pared celular, y representa el 20-25% del peso seco de la célula (Klis, 1994). La composición concreta de la pared celular parece ser específica de cada cepa de levadura, siendo una estructura compuesta por capas (Figura 18): (i) una capa interna y rígida formada por  $\beta$ -1,3 glucanos y quitina formando un fibroso entramado tridimensional; (ii) una capa externa y elástica formada por  $\beta$ -1,6 glucanos y manoproteínas. Así, la pared está compuesta en un 85%-90% de polisacáridos y un 10%-15% de proteína (Nguyen y Panon, 1998).



**Figura 18.** Estructura de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Molina et al., 2000). Se indica el porcentaje en masa de los principales componentes de la pared celular según Klis et al. (2006).

Los glucanos son los polisacáridos estructurales más importantes de la pared y constituyen el 50-60% de su peso seco. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos por unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), con ramificaciones de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). Los glucanos  $\beta$ -1,3 constituyen del 65-90% de los glucanos de la pared celular de levaduras (Pontón, 2008).

Estos  $\beta$ -1,3 glucanos forman una red fibrosa en la superficie interna de la pared que le aporta resistencia mecánica. Son sintetizados por un complejo de enzimas situado

en la membrana plasmática, denominado glucano sintetasas. Estos glucanos forman cadenas de monómeros de glucosa compuestas por aproximadamente 1.500 residuos unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). La mayoría de los  $\beta$ -1,3 glucanos tienen una conformación helicoidal (Krainer et al., 1994), formada por una o más cadenas de polisacáridos unidos por puentes de hidrógeno y que, a su vez, se unen a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas. Tal conformación proporciona a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular.

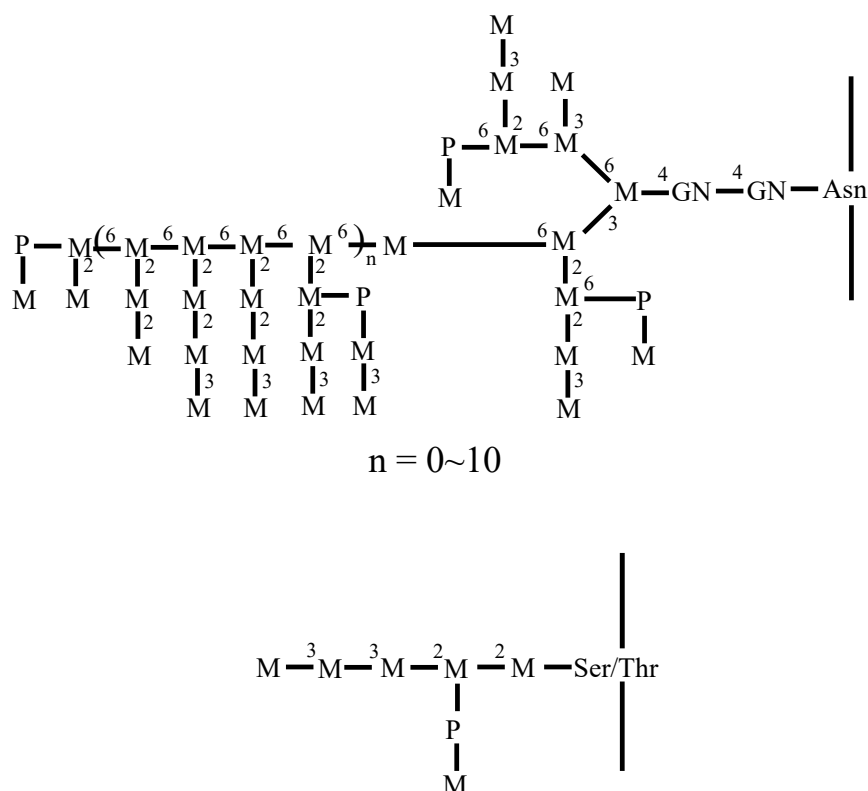
Al contrario que la estructura microfibrilar del  $\beta$ -1,3 glucano, el polímero  $\beta$ -1,6 glucano es más corto y presenta una estructura amorfa muy ramificada. Actúa a modo de “pegamento” flexible formando uniones covalentes con  $\beta$ -1,3 glucanos, quitina y manoproteínas (Kollár et al., 1997). Este polímero está formado por una media de 350 residuos de glucosa, con el 15% de los residuos del esqueleto  $\beta$ -1,6 ramificados. En células vegetativas de *S. cerevisiae*, supone el 12% de los polisacáridos de la pared (Magnelli et al., 2002). Estudios sobre la pared celular de *S. pombe* han aclarado la naturaleza y estructura de su  $\beta$ -1,6 polímero, que ha sido renombrado como diglucano por Magnelli et al. (2002). Este diglucano presenta un esqueleto con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), pero el 75% de los residuos están también unidos en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) formando un polímero altamente ramificado, más ramificado que en *S. cerevisiae*. El diglucano de *S. pombe* es moderadamente abundante, constituye el 15% de la pared celular de la levadura.

Las manoproteínas que conforman entre el 30-50% de la pared celular de levaduras, son glucoproteínas, a menudo altamente glicosiladas, localizadas en la capa más externa de la pared de levaduras, donde se conecta con una matriz amorfa de  $\beta$ -1,3 glucanos por enlaces covalentes fundamentalmente a través de los  $\beta$ -1,6 glucanos (Klis et al., 2002). Están compuestas por un 30% de péptidos, ricos en serina, treonina y asparragina, y por un 70% polisacáridos, de los cuales el 98% corresponde a manosa y el 2% a glucosa (Waters et al., 1994).

Las manoproteínas poseen una estructura tridimensional basada en un núcleo proteico al que se unen dos tipos de cadenas glicánicas: (i) unas cortas, formadas por residuos de manosa unidos a la parte proteica por enlaces O-glicosil a residuos de serina o treonina; (ii) y otras largas, con unas 150 a 250 unidades de manosa muy ramificadas y, a su vez, con otras cadenas de manosa laterales más cortas unidas a la parte proteica a



través de dos unidades de N-acetil-glucosamina que se unen a un residuo de asparragina (Klis et al., 2006) (Figura 19).



**Figura 19.** Estructura de las manoproteínas de levadura. Man, manosa; Ser, serina; Thr, treonina; Asn, asparragina; GN, N-acetil-glucosamina; P, fosfato (adaptado de Jigami y Odani, 1999).

Para otras especies de levaduras, la porción glucónica de las manoproteínas es diferente a la descrita anteriormente; las cadenas glucónicas en *S. pombe* y *K. lactis* contienen galactosa y N-acetil-glucosamina, respectivamente, pero no manosil fosfato, mientras que las cadenas glucónicas de *Kloeckera brevis* y *Candida albicans* contienen manosil fosfato como *S. cerevisiae* (Ballou, 1976). Okawa et al. (2003) encontraron en la fracción de oligosacáridos de manosa de una cepa de *T. delbrueckii*, una nueva manoheptosa con enlaces  $\alpha$  y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2).

Estas moléculas dan a la pared celular propiedades activas y juegan un papel importante en el control de la porosidad de la pared (De Nobel et al., 1990), regulando la salida de proteínas desde el espacio periplásmico y la entrada de macromoléculas del ambiente. Con el pH del vino, las manoproteínas tienen carga negativa y, por

consecuencia, pueden establecer interacciones electrostáticas e iónicas con otros componentes del vino (Vernhet et al., 1996).

Son muchas las funciones enológicas descritas atribuidas a las manoproteínas, como: (i) adsorción de ocratoxina A (Var et al., 2009; Petruzzi et al., 2015); (ii) combinación con compuestos fenólicos (Guadalupe y Ayestarán, 2008; Ribeiro et al., 2014); (iii) activación del crecimiento de bacterias malolácticas (Guilloux-Benatier et al., 1995); (iv) inhibición de la cristalización de sales de tartrato (Marchal y Jeandet, 2009); (v) formación del velo de flor (Alexandre et al., 2000); (vi) prevención del enturbiamiento en vinos blancos (Gonzalez-Ramos et al., 2008; Dufrechou et al., 2015); (vii) interacción con compuestos aromáticos (Chalier et al., 2007; Juega et al., 2012); (viii) contribución en la floculación y autólisis en la elaboración de vinos espumosos (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006; Blasco et al., 2011; Pérez-Magariño et al., 2015). Por otra parte, estudios realizados en vinos tranquilos han puesto de manifiesto que estos compuestos son los principales responsables de las mejoras obtenidas en los vinos de crianza sobre lías (Palomero et al., 2007; Juega et al., 2015; Martínez et al., 2016).

En la actualidad, se está estudiando el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* en las fermentaciones de vino como mayores productoras de manoproteínas que *S. cerevisiae* (Giovani et al., 2012), y esta capacidad de las levaduras no-*Saccharomyces* puede ser usada como un criterio de selección para su empleo en enología (Ciani et al., 2010).

### 2.5.2.2. Oligosacáridos

Los oligosacáridos son estrictamente definidos como carbohidratos no digeribles que contienen entre tres y quince residuos de monosacáridos covalentemente unidos mediante enlaces glucosídicos (Bordiga et al., 2012). Los oligosacáridos no son digeridos ni absorbidos en el tracto intestinal superior de humanos y son liberados intactos en el colon donde pueden actuar como nutrientes para la microflora intestinal (Boehm y Stahl, 2003). Estos compuestos son divididos generalmente en dos clases: neutros o ácidos; los neutros no contienen residuos con carga aniónica, mientras que los ácidos contienen uno o más residuos con carga negativa como el ácido siálico (Guggenbichler et al., 1997).

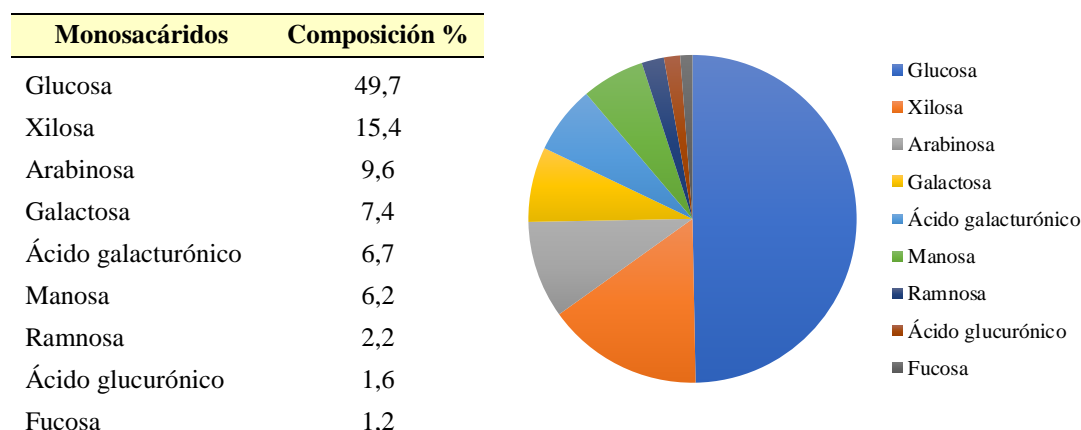
El estudio de los oligosacáridos se encuentra casi exclusivamente centrado en la leche animal, con numerosos estudios al respecto de los oligosacáridos de la leche humana (Kunz et al., 2000; Urashima et al., 2001; Newburg, 2005). Las propiedades

estructurales y funcionales de los oligosacáridos están siendo estudiadas, describiéndolos como componentes bioactivos que contribuyen a la función intestinal en humanos (Macfarlane et al., 2008). Una de las acciones más estudiadas y demostradas de los oligosacáridos es su actividad prebiótica (Gibson, 1995). En el vino, aunque la presencia de los oligosacáridos es conocida, la información sobre su composición es limitada debido a la dificultad en su separación y caracterización (Doco et al., 2015). Pese a tal dificultad, y con el fin de entender la aportación de sus propiedades organolépticas y bioactivas, resulta relevante determinar la composición exacta de los oligosacáridos del vino, así como analizar sus estructuras moleculares.

La caracterización estructural de los oligosacáridos ha sido obtenida por combinación de digestiones enzimáticas por la acción de glicosil hidrolasas con técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masas (MS, sus siglas en inglés) (Duarte et al., 2003). El análisis directo en mezclas de oligosacáridos por MS ha sido posible por el desarrollo de las técnicas de ionización suave, como por ejemplo la ionización mediante electrospray (ESI, sus siglas en inglés) (Ducasse et al., 2010b; Apolinar-Valiente et al., 2015; Doco et al., 2015).

Una de las funciones reconocida de los oligosacáridos en vino ha sido su propiedad de actuar como agente quelante de cationes (Cescutti y Rizzo, 2001). Asimismo, Quijada-Morín et al. (2014) afirmaron que la percepción de la astringencia está positivamente relacionada con ciertos monosacáridos presentes en la fracción de oligosacáridos en vinos de la variedad Tempranillo.

El primer estudio de aislamiento y caracterización de fracciones de oligosacáridos en vinos tintos fue realizado por Ducasse et al. (2010b). Posteriormente, Bordiga et al. (2012) aislaron y caracterizaron 45 oligosacáridos complejos libres en vinos tintos de la variedad Grignolino y vinos blancos de la variedad Chardonnay; estos autores mostraron la composición de monosacáridos típica encontrada en los oligosacáridos de vinos de Chardonnay (Figura 20). Estudios más recientes han mostrado las fracciones de oligosacáridos en vinos tintos de las variedades Cabernet Sauvignon, Syrah y Monastrell (Apolinar-Valiente et al., 2015), Cariñena (Doco et al., 2015) y Tempranillo (Martínez-Lapiente et al., 2016).



**Figura 20.** Composición típica de los residuos glucosídicos de oligosacáridos en vino Chardonnay (tomado de Bordiga et al., 2012).

## 2.6. Análisis sensorial

Según la norma ISO 5492:2008, el análisis sensorial es la ciencia relacionada con la valoración de las cualidades organolépticas de un producto mediante los sentidos. Hoy día, el análisis sensorial en el vino está regulado por una serie de normas y criterios de estandarización relativos a la metodología de análisis, descriptores, sala de catas, entrenamiento de los catadores, tipos de copa, etc., lo que hace que sea utilizado como una herramienta útil y reproducible en la valoración organoléptica de los vinos (Aleixandre, 2006).

Se deben seguir una serie de pasos a la hora de realizar un análisis sensorial (De la Presa Owens, 2002), como:

- i) Determinación de los objetivos de la prueba sensorial.
- ii) Selección y entrenamiento del panel de cata (ISO 5496:2006), se debe preseleccionar un grupo de panelistas considerando una serie de condiciones básicas como interés, disponibilidad, salud, normalidad de percepción fisiológica y habilidad discriminatoria, así como que sea capaz de interpretar un vocabulario específico y con reproducibilidad de juicio, mostrando concordancia entre la interpretación de los descriptores y la valoración de la magnitud de los atributos.
- iii) Elección del tipo de método de valoración sensorial, que depende principalmente del objetivo del análisis.

Las pruebas de análisis sensorial se dividen en dos grandes grupos: pruebas analíticas y pruebas afectivas/hedónicas.

#### 2.6.1. Pruebas analíticas: discriminativas y descriptivas

Estas pruebas describen objetivamente los productos. Para ello serán realizadas por jueces entrenados que miden las características sensoriales de los productos actuando como instrumentos de medida (Vallano y Chaya, 2017). La cata tendrá lugar en una sala que cumple con las normas establecidas por la ISO 8589:2010. Según el objetivo perseguido, las pruebas analíticas se pueden clasificar en pruebas discriminativas y pruebas descriptivas.

Las pruebas discriminativas se llevan a cabo con la finalidad de contrastar si la diferencia entre los vinos es perceptible (Vallano y Chaya, 2017), esta diferencia se puede considerar significativa o no dependiendo del número de catadores que han acertado la diferencia respecto al número de catadores totales. Las pruebas discriminativas más comunes empleadas en el vino son las llamadas i) dúo-trío (ISO 10399:2004): que consisten en pruebas donde se recibe un conjunto de tres muestras, una de ellas etiquetada como referencia y otras dos etiquetadas aleatoriamente siendo una de ellas igual a la referencia, los jueces han de identificar cuál de ellas es igual a la referencia; ii) triangulares (ISO 4120:2007), pruebas donde se presentan tres muestras numeradas aleatoriamente, dos de ellas iguales y una diferente, la tarea de los jueces es identificar la muestra diferente; y iii) por parejas, se estudian las diferencias de un atributo en concreto entre dos muestras.

Las pruebas descriptivas son pruebas más complejas, donde el objetivo es detectar y describir los aspectos cualitativos y cuantitativos del vino, usando una terminología estandarizada para la descripción del vino (Noble et al., 1987). Los catadores deben otorgar valores cuantitativos que relacionen la intensidad que perciben de cada uno de los atributos evaluados durante el análisis descriptivo (De la Presa Owens, 2002).

#### 2.6.2. Pruebas afectivas o hedónicas

Estas pruebas son empleadas para determinar el grado de aceptación o preferencia que el consumidor tiene por un conjunto de vinos, por un concepto o una característica

específica. Se llevan a cabo mediante el test de aceptación-preferencia y el test hedónico de 9 puntos (De la Presa Owens, 2002).

### 2.7. Bibliografía

Abela y Sáinz de Andino, E. J. (1885) 'Apéndice sobre las especies y variedades de vid', in Tipografía de Manuel G. Hernández (ed.) *El libro del viticultor*. Madrid, pp. 218–326.

Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N. y Gírio, F. (2010) 'Saccharomyces cerevisiae CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-Saccharomyces wine-related strains', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), pp. 965–972.

Aleixandre, J. L. (2006) 'La Cultura del Vino. Cata y Degustación', in *Técnicas de Cata de vinos*. 3 edición. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, pp. 45–65.

Alexandre, H., Blanchet, S. y Charpentier, C. (2000) 'Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in velum yeast which may be implicated in velum formation', *FEMS Microbiology Letters*, 185(2), pp. 147–150.

Alexandre, H. y Guilloux-Benatier, M. (2006) 'Yeast autolysis in sparkling wine- A review', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), pp. 119–127.

Alexandre, H., Rousseaux, I. y Charpentier, C. (1994) 'Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*', *FEMS Microbiol Letters*, 124, pp. 17–22.

Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. y Guillamón, J. M. (2012) 'Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile', *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), pp. 8–13.

Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M. y Esteve-Zarzoso, B. (2010a) 'Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations', *European Food Research and Technology*, 231(2), pp. 215–224.

Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M. y Mas, A. (2010b) 'Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR', *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), pp. 257–262.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M. y Esteve-Zarzoso, B. (2008) 'Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques', *Food Microbiology*, 25(7), pp. 849–856.

Anfang, N., Brajkovich, M. y Goddard, M. R. (2009) 'Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(1), pp. 1–8.

Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M. y Cabras, P. (2007) 'In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 2043–2048.

Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Williams, P., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M. y Doco, T. (2015) 'Oligosaccharides of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines', *Food Chemistry*, 179, pp. 311–317.

Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Mazerolles, G., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M. y Doco, T. (2014a) 'Effect of enzyme additions on the oligosaccharide composition of Monastrell red wines from four different wine-growing origins in Spain', *Food Chemistry*, 156, pp. 151–159.

- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Williams, P., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M. y Doco, T. (2014b) 'Effect of winemaking techniques on polysaccharide composition of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), pp. 62–71.
- Arroyo, T., Lozano, J., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., Santos, J. P. y Horrillo, C. (2009) 'Evaluation of wine aromatic compounds by a sensory human panel and an electronic nose', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), pp. 11543–11549.
- Atienza J., Esteve, M.D., Aragón, P. y Climent, M. D. (1999) *La espectrometría de masas y el aroma del vino*. Edited by Ediciones y Promociones L.A.V. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F. y Zapparoli, G. (2015) 'Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), pp. 277–293.
- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J. M. y Aznar, M. (2011) 'Sensory and olfactometric profiles of red wines after natural and forced oxidation processes', *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), pp. 527–5365.
- Ballou, C. (1976) 'Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope', *Advances in Microbial Physiology*, 14, pp. 93–158.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (1990) *Yeasts: Characteristics and Identification*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Barnett, J. A. (1998) 'A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789–1850', *Yeast*, 14, pp. 1439–1451.
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J. M., Salmon, J. M. y Barre, P. (1996) 'Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics', *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), pp. 145–150.
- Bauer, E. F. y Pretorius, L. S. (2000) 'Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine-A review', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), pp. 27–51.
- Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. y Drawert, F. (1986) 'Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37, pp. 927–943.
- Bejarano, P. C. y Martínez Zapater, J. M. (2013) 'Estructura y composición de la uva y su contribución al vino', *ACE: Revista de enología*, 139.
- Bell, S. J. y Henschke, P. a (2005) 'Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), pp. 242–295.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N. y Mas, A. (2002) 'Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study', *Systematic and Appl Microbiology*, 25(2), pp. 287–93.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. y Dubourdieu, D. (2008) 'Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), pp. 312–320.
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S., Ebeler, S. y Hopfer, H. (2015b) 'Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production', *Molecules*, 20, pp. 9510–9523.
- Benito, Á., Jeffares, D., Palomero, F., Calderón, F., Bai, F. Y., Bähler, J. y Benito, S. (2016) 'Selected *Schizosaccharomyces pombe* strains have characteristics that are beneficial for winemaking', *PLoS ONE*, 11(3), pp. 5–6.



## 2. INTRODUCCIÓN

- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J. y Rauhut, D. (2015a) 'Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*', *European Food Research and Technology*, 241(5), pp. 707–717.
- Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palmero, D. y Suárez-Lepe, J. A. (2014) 'Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking', *Food Microbiology*, 42, pp. 218–224.
- Bevan, E. A. y Makover, M. (1963) 'The physiological basis of the killer character in yeasts', in Geert, S. (ed.) *Genetics Today XI International Congress on Genetics*. Oxford: Oxford Pergamon Press, pp. 53–58.
- Bisson, L. F. (1999) 'Stuck and sluggish fermentations', *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), pp. 107–119.
- Bisson, L. F. (2004) 'The biotechnology of wine yeast', *Food Biotechnology*, 18(1), pp. 63–96.
- Blasco, L., Viñas, M. y Villa, T. G. (2011) 'Proteins influencing foam formation in wine and beer: The role of yeast', *International Microbiology*, 14(2), pp. 61–71.
- Bochner, B. R. (2003) 'New technologies to assess genotype-phenotype relationships', *Nature Reviews Genetics*, 4, pp. 309–314.
- Bochner, B. R., Gadzinski, P. y Panomitros, E. (2001) 'Phenotype Microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function', *Genome Research*, 11(7), pp. 1246–1255.
- Boehm, G. y Stahl, B. (2003) 'Oligosaccharides', in Mattila, T., Saarela, M. (ed.) *Functional dairy products*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., pp. 203–243.
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M. y Mills, D. A. (2014) 'Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), pp. 139–148.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Meyrand, M., German, J. B., Lebrilla, C. B., Coisson, J. D., Arlorio, M. y Barile, D. (2012) 'Identification and characterization of complex bioactive oligosaccharides in white and red wine by a combination of mass spectrometry and gas chromatography', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), pp. 3700–3707.
- Borglin, S., Joyner, D., Jacobsen, J., Mukhopadhyay, A. y Hazen, T. C. (2009) 'Overcoming the anaerobic hurdle in phenotypic microarrays: Generation and visualization of growth curve data for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough', *Journal of Microbiological Methods*, 76(2), pp. 159–168.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. y Kunkee, R. E. (1996) *Principles and practices of winemaking*. New York: Chapman & Hall, p. 604.
- Bradbury, J. E., Richards, K. D., Niederer, H. A., Lee, S. A., Rod Dunbar, P. y Gardner, R. C. (2006) 'A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains', *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(1), pp. 27–38.
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., Caldeira, J. y Albergaria, H. (2014) 'Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), pp. 843–853.
- Brandam, C., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A. y Taillandier, P. (2013) 'Influence of oxygen on alcoholic fermentation by a wine strain of *Torulaspora delbrueckii*: Kinetics and carbon mass balance', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(9), pp. 1848–1853.
- Braus, G. H. (1991) 'Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway', *Microbiological Reviews*, 55(3), pp. 349–370.
- Cacho, J. F. (2003) *El vino, su composición y nuestros sentidos; discurso de ingreso leído por el académico electo Ilmo. Sr. D. Juan F. Cacho Palomar en el acto de su recepción solemne celebrado el día 2 de diciembre del año 2003 y discurso de contestación por el Ilmo. Sr. D. Zaragoza*: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza.



- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F. y Spano, G. (2015) 'Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine', *Microbiological Research*, 181, pp. 75–83.
- Castro, R., Natera, R., Benitez, P. y Barroso, C. G. (2004) 'Comparative analysis of volatile compounds of "fino" sherry wine by rotatory and continuous liquid–liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry', *Analytica Chimica Acta*, 513, pp. 141–150.
- Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M. G. y Dejana, E. (1996) 'Inhibition of cultured cell growth by vascular endotelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin)', *Journal of Clinical Investigation*, 98(4), pp. 886–893.
- Cescutti, P. y Rizzo, R. (2001) 'Divalent cation interactions with oligogalacturonides.', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 3262–3267.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T. y Gunata, Z. (2007) 'Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains', *Food Chemistry*, 100(1), pp. 22–30.
- Chambers, P. J., Borneman, A. R., Varela, C., Cordente, A. G., Bellon, J. R., Tran, T. M. T., Henschke, P. A. y Curtin, C. D. (2015) 'Ongoing domestication of wine yeast: Past, present and future', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, pp. 642–650.
- Chambers, P. J. y Pretorius, I. S. (2010) 'Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research.', *EMBO Reports*, 11(12), pp. 914–20.
- Charoenchai, C., Fleet, G. H. y Henschke, P. A. (1998) 'Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts', *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, pp. 283–288.
- Chatonnet, P., Duboudieu, D. y Boidron, J. N. (1995) 'The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines', *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(4), pp. 463–468.
- Chaves, M., Zea, L., Moyano, L. y Medina, M. (2007) 'Changes in color and odorant compounds during oxidative aging of Pedro Ximénez sweet wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 3592–3598.
- Cheraiti, N., Cheraiti, N., Salmon, J., Guezenc, S. y Salmon, J. (2005) 'Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions', *Society*, 71(1), pp. 255–260.
- Ciani, M., Beco, L. y Comitini, F. (2006) 'Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations', *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), pp. 239–245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. y Domizio, P. (2010) 'Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking', *FEMS Yeast Research*, 10(2), pp. 123–133.
- Ciani, M. y Ferraro, L. (1998) 'Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines', *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), pp. 247–254.
- Ciani, M. y Maccarelli, F. (1998) 'Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), pp. 199–203.
- Civilini, M. (2009) 'Identification and characterization of bacteria isolated under selective pressure of volatile organic compounds', *Journal of Environmental Biology*, 30(1), pp. 99–105.
- Clemente-Jiménez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J. y Rodríguez-Vico, F. (2004) 'Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must', *Food Microbiology*, 21(2), pp. 149–155.
- Clemente-Jiménez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J. y Rodríguez-Vico, F. (2005) 'Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), pp. 301–308.

- Cocolin, L., y Mills, D. A. (2003) 'Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: A comparison of culture-dependent and independent methods', *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, pp. 125–130.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R. y Rantsiou, K. (2013) 'Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), pp. 29–43.
- Cole, V. C. y Noble, A. C. (2003) 'Flavor chemistry', in Lea, A. G. H. and Piggott, J. R. (ed.) *Fermented beverage production*. 2nd edn. New York: Kluwer Academic, pp. 393–412.
- Cominiti, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2011) 'Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Microbiology*, 28(5), pp. 873–882.
- Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2005) 'Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*', *Journal of Applied Microbiology*, 99, pp. 105–111.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S. y Gerós, H. (2007) 'Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality', *Structure*, 1(1), pp. 1–22.
- Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A. y Guillaumon, J. M. (1998) 'Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 41(3), pp. 169–175.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C. y Varela, C. (2014) 'Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), pp. 1670–1678.
- Coombe, B. G. (1992) 'Research on development and ripening of the grape berry', *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, pp. 101–110.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. y Valero, E. (2011) 'Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries', *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), pp. 23–29.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M. y Arroyo, T. (2013) 'Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.)', *European Food Research and Technology*, 236(1), pp. 193–207.
- Corison, C. A., Ough C. S., Berg, H. W. y Nelson, K. E. (1979) 'Must acetic acid and ethyl acetate as mold rot indicators in grapes', *American Journal of Enology and Viticulture*, 30, pp. 130–134.
- Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarek, E. B. y Fox, A. J. (2000) 'Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16s rRNA PCR', *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), pp. 1747–1752.
- David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Masneuf-Pomarede, I., Ranjard, L. y Alexandre, H. (2014) 'High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(5), pp. 811–821.
- De Benedictis, M., Blevé, G., Grieco, F., Tristezza, M. y Tufariello, M. (2011) 'An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures', *Antoine van Leeuwenhoek*, 99, pp. 189–200.
- Degré, R. (1993) 'Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria', in Fleet, G. H. (ed.) *Wine microbiology and biotechnology*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, pp. 421–447.
- De la Presa Owens, C. (2002) 'Aplicaciones del análisis sensorial en la industria vitivinícola', in *III Foro Mundial del Vino*, p. 8.

- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J. L. y Le Jeune, C. (2004) 'Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery', *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), pp. 1140–1148.
- Denittis, M., Querol, A., Zannoni, B., Minati, J. L. y Ambrosoli, R. (2010) 'Possible use of Biolog methodology for monitoring yeast presence in alcoholic fermentation for wine-making', *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), pp. 1199–1206.
- De Nobel, J. G., Klis, F. M., Priem, J., Munnik, T. y Van Den Ende, H. (1990) 'The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 6(6), pp. 491–499.
- Díaz, C., Molina, A. M., Nähring, J. y Fischer, R. (2013) 'Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae', *BioMed Research International*, 2013.
- Divol, B. y Lonvaud-Funel, A. (2005) 'Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine', *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), pp. 85–93.
- Doco, T., Brillouet, J.M. y Moutounet, M. (1996) 'Evolution of grape (Carignan noir cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration', *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), pp. 108–110.
- Doco, T. y Brillouet, J. (1993) 'Isolation and characterisation of a rhamnogalacturonan from red wine', *Carbohydrates Research*, 243, pp. 333–343.
- Doco, T., Quéllec, N., Moutounet, M. y Pellerin, P. (1999) 'Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines', *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), pp. 25–32.
- Doco, T., Williams, P. y Cheynier, V. (2007) 'Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), pp. 6643–6649.
- Doco, T., Williams, P., Meudec, E., Cheynier, V. y Sommerer, N. (2015) 'Complex carbohydrates of red wine: Characterization of the extreme diversity of neutral oligosaccharides by ESI-MS', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), pp. 671–682.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'Neill, M. A. y Pellerin, P. (2003) 'Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides', *Carbohydrate Polymers*, 53(3), pp. 253–261.
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F. y Barile, D. (2014) 'Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine', *Food Microbiology*, 43, pp. 5–15.
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2011) 'Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), pp. 170–180.
- Doores, S. (2005) 'Organic acids', in Davidson, P. M., Sofos, J. N., and Branen, A. L. (ed.) *Antimicrobials in Food*. 3rd editio. Florida: Taylor&Francis Group, pp. 91–142.
- Duarte, I. F., Godejohann, M., Braumann, U., Spraul, M. y Gil, A. M. (2003) 'Application of NMR spectroscopy and LC-NMR/MS to the identification of carbohydrates in beer', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), pp. 4847–4852.
- Ducasse, M. A., Williams, P., Meudec, E., Cheynier, V. y Doco, T. (2010a) 'Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS', *Carbohydrate Polymers*, 79(3), pp. 747–754.
- Ducasse, M., Canal-Llauberes, R., De Lumley, M., Williams, P., Souquet, J., Fulcrand, H., Doco, T. y Cheynier, V. (2010b) 'Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines', *Food Chemistry*, 112(2), pp. 369–376.
- Dufrechou, M., Doco, T., Poncet-Legrand, C., Sauvage, F. X. y Vernhet, A. (2015) 'Protein/Polysaccharide interactions and their impact on haze formation in white wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), pp. 10042–10053.

- Edwards, C. G., Beelman, R. B., Bartley, C. E. y McConnell, A. L. (1990) 'Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification', *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, pp. 48–56.
- Etiévant, X. P. (1991) 'Wine', in Maarse, H. (ed.) *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. New York: Marcel Dekker, p. 483.546.
- Ewart, A. (2003) 'White wines', in Lea, A.G.H., Piggott, J. R. (ed.) *Fermented beverage production*. Boston, MA: Springer, pp. 89–106.
- Falconer, R. J. y Hart, A. (2005) 'MOG removal system makes its mark', *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 501, pp. 18–22.
- Fernández-Espinar, M. T., Martorell, P., De Llanos, R. y Querol, A. (2006) 'Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages', in Querol A. & Fleet, G. H. (ed.) *The Yeast Handbook- Yeasts in Food and Beverages*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 55–82.
- Ferraro, T. N., Schill, J. F., Ballas, C., Mulholland, N., Golden, G. T., Smith, G. G., Buono, R. J. y Berrettini, W. H. (1998) 'Genotyping microsatellite polymorphisms by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining: application to quantitative trait loci analysis of seizure susceptibility in mice.', *Psychiatric Genetics*, 8(4), pp. 227–233.
- Ferreira, V., López, R. y Cacho, J. F. (2000) 'Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), pp. 1659–1667.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R. y Cacho, J. (2002) 'Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), pp. 4048–4054.
- Fiechter, A. y Seghezzi, W. (1992) 'Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells', *Journal of Biotechnology*, 27(1), pp. 27–45.
- Fleet, G. H. (1992) 'Spoilage Yeasts', *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(1–2), pp. 1–44.
- Fleet, G. H. (1990) 'Growth of yeasts during wine fermentations', *Journal of Wine Research*, 1(3), pp. 211–223.
- Fleet, G. H. (2003) 'Yeast interactions and wine flavour', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 11–22.
- Fleet, G. H. (2007) 'Wine', in M. P. Doyle and L. R. Beuchat (ed.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 3rd Ed. Washington, DC.: ASM Press, pp. 863–890.
- Fleet, G. H. (2008) 'Wine yeasts for the future', *FEMS Yeast Research*, 8(7), pp. 979–995.
- Fleet, G. H., Heard, G. M. y Gao, C. (1989) 'The effects of temperature on the growth and ethanol tolerance of yeasts during wine fermentation', *Yeast*, 45, pp. 43–46.
- Fleet G. H. y Heard, G. M. (1993) 'Yeast growth during fermentation', in GH, F. (ed.) *Wine microbiology and biotechnology*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, pp. 27–54.
- Francis, I. L. y Newton, J. L. (2005) 'Determining wine aroma from compositional data', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, pp. 114–126.
- Fugelsang, K. C. y Edwards, C. G. (2007) *Wine Microbiology Practical Applications and Procedures*. 2nd ed. New York: Springer Science+Business Media, LLC., p. 394.
- Gafner, J. y Schültz, M. (1996) 'Impact of glucose-fructose ratio on stuck fermentations: Practical experiences to restart stuck fermentation', *Viticulture and Enology Science*, 51, pp. 214–218.
- Garcia, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E. y Günata, Z. (2002) 'Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine', *Food Microbiology and Safety*, 67(3), pp. 1138–1143.

- Gardner, N., Rodrigue, N. y Champagne, C. P. (1993) 'Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*', *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), pp. 2022–2028.
- Gerbaud, V., Gabas, N., Laguerie, C., Blouin, J., Vidal, S., Moutounet, M. y Pellerin, P. (1996) 'Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions', *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, 74(4), pp. 782–790.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995) 'Dietary modulation of the human colonic microbiota-Introducing the concept of prebiotics', *Journal of the Nutrition*, 125(6), pp. 1401–1412.
- Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T. y Prodanov, M. (2006) 'Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin "Vinos de Madrid" (Spain)', *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), pp. 145–153.
- Gilbert, J. A., Van der Lelie, D. y Zarraonaindia, I. (2014) 'Microbial terroir for wine grapes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), pp. 5–6.
- Giovani, G., Rosi, I. y Bertuccioli, M. (2012) 'Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), pp. 113–118.
- Giudici, P., Romano, P. y Zambonelli, C. (1990) 'A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*', *Canadian Journal of Microbiology*, 36(1), pp. 61–64.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2013) '*Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine', *Food Microbiology*, 33(2), pp. 271–281.
- Gobbi, M., De Vero, L., Solieri, L., Comitini, F., Oro, L., Giudici, P. y Ciani, M. (2014) 'Fermentative aptitude of non-*Saccharomyces* wine yeast for reduction in the ethanol content in wine', *European Food Research and Technology*, 239(1), pp. 41–48.
- Gómez, E., Laencina, J. y Martínez, A. (1994) 'Vinification effects on changes in volatile compounds of wine', *Journal of Food Science*, 59(2), pp. 406–409.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F. y Brena, B. M. (2011) 'A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine', *Process Biochemistry*, 46, pp. 385–389.
- Gonzalez-Ramos, D., Cebollero, E. y Gonzalez, R. (2008) 'A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), pp. 5533–5540.
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. M. y Zamora, F. (2015) 'Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production', *European Food Research and Technology*, 240(5), pp. 999–1012.
- González Techera, A., Jubany, S., Carrau, F. M. y Gaggero, C. (2001) 'Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers', *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), pp. 71–75.
- Govender, P., Kroppenstedt, S. y Bauer, F. F. (2011) 'Novel wine-mediated FLO11 flocculation phenotype of commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with modified FLO gene expression', *FEMS Microbiology Letters*, 317(2), pp. 117–126.
- Greetham, D. (2014) 'Phenotype microarray technology and its application in industrial biotechnology', *Biotechnology Letters*, 36(6), pp. 1153–1160.
- Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Williams, P. y Doco, T. (2015) 'Determination of must and wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size-exclusion chromatography (SEC)', in Ramawat, K. G., Mérillon, J. M. (ed.) in *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Switzerland: Springer International Publishing, pp. 1265–1297.



## 2. INTRODUCCIÓN

- Guadalupe, Z. y Ayestarán, B. (2007) 'Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), pp. 10720–10728.
- Guadalupe, Z. y Ayestarán, B. (2008) 'Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), pp. 9022–9029.
- Guggenbichler, J. P., De Bettignies-Dutz, A., Meissner, P., Schellmoser, S. y Jurenitsch, J. (1997) 'Acidic oligosaccharides from natural sources block adherence of *Escherichia coli* on uroepithelial cells', *Pharmacology Letters*, 7, pp. 35–38.
- Guilloux-Benatier M., Guerreau, J. y Feuillat, M. (1995) 'Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms', *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, pp. 486–492.
- Guth, H. (1997) 'Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp. 3027–3032.
- Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F. N. y Guillamon, J. M. (2012) 'Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must', *Food Microbiology*, 31(1), pp. 25–32.
- Gutiérrez, A. R., Santamaría, P., Epifanio, S., Garijo, P. y López, R. (1999) 'Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years', *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), pp. 411–415.
- Hallsworth, J. E. (1998) 'Ethanol-induced water stress in yeast', *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(2), pp. 125–137.
- Hanl, L., Sommer, P. y Arneborg, N. (2005) 'The effect of decreasing oxygen feed rates on growth and metabolism of *Torulaspora delbrueckii*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), pp. 113–118.
- Hansen, E. H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C. y Arneborg, N. (2001) 'The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Applied Microbiology*, 91, pp. 541–547.
- Heard, G. M. (1999) 'Novel yeasts in winemaking-Looking to the future', *Food Australia*, 51(8), pp. 347–352.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C. y Dujon, B. (2001) 'Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains', *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), pp. 551–559.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A. y Guillamón, J. M. (2006) 'Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), pp. 7148–7155.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A. y Guillamón, J. M. (2007) 'Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR', *FEMS Yeast Research*, 7(8), pp. 1340–1349.
- Hirano, M., Hirano, K., Nishimura, J. y Kanaide, H. (2001) 'Transcriptional upregulation of p27-Kip1 during contact-induced growth arrest in vascular endothelial cells', *Experimental Cell Research*, 271, pp. 356–367.
- Hohmann, S. (1997) 'Shaping up: The response of yeast to osmotic stress', in Hohmann, S. & Mager, W. H. (ed.) *Yeast stress response*. Austin: R.G. Landes Company, pp. 101–145.
- Hohmann, S. (2002) 'Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts Osmotic', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), pp. 300–372.
- Houtman, A., Marais, J. y Du Plessis, C. (1980) 'Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wines', *Vitis*, pp. 37–54.

- Howell, K. S., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H. y Henschke, P. A. (2004) 'Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation', *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), pp. 315–320.
- Howell, K. S., Cozzolino, D., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H. y Henschke, P. A. (2006) 'Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation', *FEMS Yeast Research*, 6(1), pp. 91–101.
- Ivey, M. L. y Phister, T. G. (2011) 'Detection and identification of microorganisms in wine: A review of molecular techniques', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(10), pp. 1619–1634.
- Jackson, R. S. (2000) *Wine science-Principles, practice, perception*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, p. 645.
- Jackson, R. S. (2014) 'Fermentation', in *Wine Science: Principles and Applications*. 4th ed. London, UK: Academic Press, pp. 424–532.
- Jain, V. K., Divol, B., Prior, B. A. y Bauer, F. F. (2012) 'Effect of alternative NAD<sup>+</sup>-regenerating pathways on the formation of primary and secondary aroma compounds in a *Saccharomyces cerevisiae* glycerol-defective mutant', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, pp. 131–141.
- James, S. A., Collins, M. D. y Roberts, I. N. (1996) 'Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), pp. 189–194.
- Janisiewicz, W. J. y Buyer, J. S. (2010) 'Culturable bacterial microflora associated with nectarine fruit and their potential for control of brown rot', *Canadian Journal of Microbiology*, 56(6), pp. 480–486.
- Janisiewicz, W. J., Kurtzman, C. P. y Buyer, J. S. (2010) 'Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot', *Yeast*, 27, pp. 389–398.
- Jigami, Y. y Odani, T. (1999) 'Mannosylphosphate transfer to yeast mannan', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426(2), pp. 335–345.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. H. P. y Pretorius, I. S. (2003a) 'The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), pp. 55–62.
- Jolly, N. P., Pretorius, I. S. y Augustyn, O. P. H. (2003b) 'The Use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), pp. 63–69.
- Jolly, N. P., Varela, C. y Pretorius, I. S. (2014) 'Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered', *FEMS Yeast Research*, 14(2), pp. 215–237.
- Juega, M., Carrascosa, A. V. y Martinez-Rodriguez, A. J. (2015) 'Effect of short ageing on lees on the mannoprotein content, aromatic profile, and sensorial character of white wines', *Journal of Food Science*, 80(2), pp. 384–388.
- Juega, M., Nunez, Y. P., Carrascosa, A. V. y Martinez-Rodriguez, A. J. (2012) 'Influence of yeast mannoproteins in the aroma improvement of white wines', *Journal of Food Science*, 77(8), 499–504.
- Julien, A., Roustan, J. L., Dulau, L. y Sablayrolles, J. M. (2000) 'Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences', *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, pp. 215–222.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M. y Nerantzis, E. (2007) 'Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), pp. 735–739.
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M. G., Caldeira, J., Albergaria, H. y Arneborg, N. (2015) 'Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Microbiology Letters*, 362(14), pp. 1–8.

## 2. INTRODUCCIÓN

- Kim, D. H., Hong, Y. A. y Park, H. D. (2008) 'Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine', *Biotechnology Letters*, 30, pp. 1633–1638.
- Klis, F. M. (1994) 'Review: Cell wall assembly in yeast', *Yeast*, 10(7), pp. 851–869.
- Klis, F. M., Boorsma, A. y De Groot, P. W. J. (2006) 'Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 23(3), pp. 185–202.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. y Stanley, B. (2002) 'Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Microbiology Reviews*, 26, pp. 239–256.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Krieger-Weber, S., du Toit, M. y Rauhut, D. (2012) 'Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, pp. 1143–1153.
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, Herman, J. C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J. C., Klis, Frans, M. y Cabib, E. (1997) 'Architecture of the Yeast Cell Wall', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(28), pp. 17762–17775.
- Koutny, M. y Zoralkova, L. (2005) 'Miniaturized kinetic growth inhibition assay with denitrifying bacteria *Paracoccus denitrificans*', *Chemosphere*, 60(1), pp. 49–54.
- Krainer, E., Stark, R. E., Naider, F., Alagramam, K. y Becker, J. M. (1994) 'Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning <sup>13</sup>C-NMR', *Biopolymers*, 34, pp. 1627–1635.
- Kreger van Rij, N. J. W. (1984) *The Yeasts. A taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV., p. 1082.
- Kulkarni, P., Loira, I., Morata, A., Tesfaye, W., González, M. C. y Suárez-Lepe, J. A. (2015) 'Use of non-*Saccharomyces* yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters', *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), p. 1255–1262.
- Kunkee, R. E. (1984) 'Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation', *Food Microbiology*, 1(4), pp. 315–332.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. y Strobel, S. (2000) 'Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects', *Annual Review of Nutrition*, 20(1), pp. 699–722.
- Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. (1998) 'Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences', *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), pp. 331–371.
- Kurtzman, C.P. y Fell, J. W. (1998) *The Yeasts. A taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, p. 1076.
- Lambrechts, M. G. y Pretorius, I. S. (2000) 'Yeast and its importance to wine aroma-A review', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), pp. 97–129.
- Lea, A. G. H. y Arnold, G. M. (1978) 'The phenolics of ciders: bitterness and astringency', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), pp. 478–483.
- Legras, J. L., Ruh, O., Merdinoglu, D. y Karst, F. (2005) 'Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains', *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), pp. 73–83.
- Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I. y Angulo, L. (1996) 'Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma', *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2), pp. 406–416.
- Lomolino, G. y Curioni, A. (2007) 'Protein haze formation in white wines: Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components prepared with different procedures', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 8737–8744.



- Lopes, C. A., Van Broock, M., Querol, A. y Caballero, A. C. (2002) 'Saccharomyces cerevisiae wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales', *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), pp. 608–615.
- Loureiro, V. y Malfeito-Ferreira, M. (2003) 'Spoilage yeasts in the wine industry', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 23–50.
- Lozano, J., Santos, J. P., Suarez, J. I., Cabellos, M., Arroyo, T. y Horrillo, C. (2015) 'Automatic sensor system for the continuous analysis of the evolution of wine', *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(2), pp. 148–155.
- Lund, S. T. y Bohlmann, J. (2006) 'The molecular basis for wine grape-A volatile subject', *Science*, 311, pp. 804–805.
- Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A. y Salmon, J.-M. (2004) 'Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), pp. 25–32.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. y Macfarlane, S. (2008) 'Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics', *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), pp. 305–344.
- Magnelli, P., Cipollo, J. F. y Abeijon, C. (2002) 'A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and  $\beta$ -1,6-glucan fine structure', *Analytical Biochemistry*, 301(1), pp. 136–150.
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G. A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M. y Bardi, L. (2008) 'Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity', *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), pp. 84–91.
- Mannazzu, I., Clementi, F. y Ciani, M. (2002) 'Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters', *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, pp. 19–35.
- Marais, J. y Pool, H. J. (1980) 'Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines', *Vitis*, 19, pp. 151–169.
- Marchal, R. y Jeandet, P. (2009) 'Use of enological additives for colloid and tartrate salt stabilization in white wines and for improvement of sparkling wine foaming properties', in Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (ed.) *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, pp. 127–158.
- Marks, V. D., Ho Sui, S. J., Erasmus, D., Van Der Merwe, G. K., Brumm, J., Wasserman, W. W., Bryan, J. y Van Vuuren, H. J. J. (2008) 'Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response', *FEMS Yeast Research*, 8(1), pp. 35–52.
- Marsit, S. y Dequin, S. (2015) 'Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review', *FEMS Yeast Research*, 15(7), pp. 1–40.
- Martínez-Lapuente, L., Apolinar-Valiente, R., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., Williams, P. y Doco, T. (2016) 'Influence of grape maturity on complex carbohydrate composition of red sparkling wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), pp. 5020–5030.
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A. y Beltran, G. (2012) 'Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source', *FEMS Yeast Research*, 12(4), pp. 477–485.
- Martínez, J. M., Cebrián, G., Álvarez, I. y Raso, J. (2016) 'Release of mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* autolysis induced by pulsed electric field', *Frontiers in Microbiology*, 7:1435.
- Martini, A., Ciani, M. y Scorzett, G. (1996) 'Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces', *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(4), pp. 435–440.
- Martorell, P., Querol, A. y Ferra, M. T. (2005) 'Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), pp. 6823–6830.

- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E. y Carrau, F. (2013) 'Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*', *Food Chemistry*, 141(3), pp. 2513–2521.
- Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J. y Nombela, C. (2000) 'Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis', *Microscopy Research and Technique*, 51(6), pp. 601–612.
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T. y Vasconcelos, I. (2008) 'Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must', *International Journal of Food Microbiology*, 124, pp. 231–238.
- Navarro-Aviño, J. P., Prasad, R., Miralles, V. J., Benito, R. M. y Serrano, R. (1999) 'A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible ALD2 and ALD3 genes.', *Yeast*, 15(10A), pp. 829–842.
- Navarro Tapia, E. (2016) *Estudio de la adaptación a estrés por etanol en cepas de Saccharomyces cerevisiae*. Valencia: Universidad de Valencia.
- Nehme, N., Mathieu, F. y Taillandier, P. (2010) 'Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction', *Food Microbiology*, 27(1), pp. 150–157.
- Nevoigt, E. y Stahl, U. (1997) 'Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), pp. 231–241.
- Newburg, D. S. (2005) 'Innate immunity and human milk', *The Journal of Nutrition*, 135(5), pp. 1308–1312.
- Nguyen, H. V. y Panon, G. (1998) 'The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species', *Sciences des Aliments*, 18, pp. 515–526.
- Nishihara, H., Kio, K., y Imamura, M. (2000) 'Possible mechanism of co-flocculation between non-flocculent yeasts', *Journal of The Institute of Brewing*, 106(1), pp. 7–10.
- Nissen, P. y Arneborg, N. (2003) 'Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*', *Archives of Microbiology*, 180(4), pp. 257–263.
- Nissen, P., Neilsen, D. y Arneborg, N. (2004) 'The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeasts play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), pp. 543–550.
- Nissen, P., Nielsen, D. y Arneborg, N. (2003) 'Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism', *Yeast*, 20(4), pp. 331–341.
- Noble, A. C., Arnold, R. A., Buechsenstein, J., Leach, E. J., Schmidt, J. O. y Stern, P. M. (1987) 'Modification of a standardized system of wine aroma terminology', *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(2), pp. 143–146.
- Noble, A. C. y Bursick, G. F. (1984) 'The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine.', *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), pp. 110–112.
- Noti, O., Vaudano, E., Pessione, E. y Garcia-Moruno, E. (2015) 'Short-term response of different *Saccharomyces cerevisiae* strains to hyperosmotic stress caused by inoculation in grape must: RT-qPCR study and metabolite analysis', *Food Microbiology*, 52, pp. 49–58.
- Nykanen, L., Nykanen, I. y Suomalainen, H. (1977) 'Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium', *Journal of the Institute of Brewing*, 83, pp. 32–34.
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I. and Martínez-Téllez, M. Á. (2012) 'Plant cell wall polymers: Function, structure and biological activity of their derivatives', in De Souza Gomes, A. (ed.) *Polymerization*. Rijeka, Croatia: InTech, pp. 63–86.

- Okawa, Y., Monma, K., Shibata, N., Kobayashi, H. y Yamada, Y. (2003) 'A new mannoheptaose containing  $\alpha$  and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2) linkages isolated from the mannan of *Torulaspora delbrueckii*: ELISA inhibition studies', *Carbohydrate Research*, 338(11), pp. 1175–1182.
- Oro, L., Ciani, M. y Comitini, F. (2014) 'Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts', *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), pp. 1209–1217.
- Osborne, J. P. y Edwards, C. G. (2007) 'Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation', 118, pp. 27–34.
- Ough, C. S. y Amerine, M. A. (1988) *Methods analysis of musts and wines*. New York: Wiley-Interscience, p. 400.
- Pace, N. R. (1997) 'A molecular view of microbial diversity and the biosphere', *Science*, 276, pp. 734–740.
- Padilla, B., Gil, J. V. y Manzanares, P. (2016) 'Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity', *Frontiers in Microbiology*, 7:411.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderón, F. y Suárez-Lepe, J. A. (2009) 'New genera of yeasts for over-lees aging of red wine', *Food Chemistry*, 112(2), pp. 432–441.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., González, M. C. y Suárez-Lepe, J. A. (2007) 'Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content', *Food Chemistry*, 105(2), pp. 838–846.
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A. y Mauricio, J. C. (2004) 'Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration', *Food Chemistry*, 84, pp. 585–590.
- Pellerin, P. y Cabanis, J. C. (2003) 'Los glúcidos', in Flanzky, C. (ed.) *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Mundi Prensa, pp. 66–96.
- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. M. y O'Neill, M. A. (1996) 'Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II', *Carbohydrate Research*, 290(2), pp. 183–197.
- Pellerin, P., O'Neill, M., Pierre, C., Cabanis, M., Darvill, A., Albersheim, P. y Moutounet, M. (1997) 'Lead complexation in wines with the dimers of the grape pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II', *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31(1), pp. 33–41.
- Peng, X., Sun, J., Iserentant, D., Michiels, C., y Verachtert, H. (2001) 'Flocculation and coflocculation of bacteria by yeasts', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, pp. 777–781.
- Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F. F., Marques, J. C. y Câmara, J. S. (2006) 'Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds', *Analytica Chimica Acta*, 563, pp. 154–164.
- Pérez-Magariño, S., Martínez-Lapuente, L., Bueno-Herrera, M., Ortega-Heras, M., Guadalupe, Z. y Ayestarán, B. (2015) 'Use of commercial dry yeast products rich in mannoproteins for white and rosé sparkling wine elaboration', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), pp. 5670–5681.
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T. y Girio, F. (2006) 'Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*', *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), pp. 336–345.
- Pérez, F., Ramírez, M. y Regodón, J. A. (2001) 'Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation', *Antonie Van Leeuwenhoek*, 79, pp. 393–399.
- Petruzzi, L., Baiano, A., De Gianni, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. R. y Bevilacqua, A. (2015) 'Differential adsorption of ochratoxin a and anthocyanins by inactivated yeasts and yeast cell walls during simulation of wine aging', *Toxins*, 7(10), pp. 4350–4365.
- Phister, T. G. y Mills, D. a (2003) 'Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp. 7430–7434.

- Piendl, A. y Geiger, E. (1980) 'Technological factors in the formation of esters during fermentation', *Brewing Technology*, 55, pp. 26–35.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J. A. y Hogg, T. (2004) 'Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions', *Food Microbiology*, 21(4), pp. 439–447.
- Pinot, C., Deredjian, A., Nazaret, S., Brothier, E., Cournoyer, B., Segonds, C. y Favre-Bonté, S. (2011) 'Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: A rapid and efficient procedure', *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), pp. 1185–1193.
- Piper, P. W. (1997) 'The yeast heat shock response', in Hohmann, S. & Mager, W. H. (ed.) *Yeast stress responses*. Austin: R.G. Landes Company, pp. 75–99.
- Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P. y Vernhet, A. (2007) 'Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight', *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), pp. 87–91.
- Pontón, J. (2008) 'The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin', *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), pp. 78–82.
- Pratt, P. L., Bryce, J. H. y Stewart, G. G. (2003) 'The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology', *Journal of the Institute of Brewing*, 109(3), pp. 218–228.
- Pretorius, I. S. (2000) 'Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking', *Yeast*, 16(8), pp. 675–729.
- Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T. y Escribano-Bailón, M. T. (2014) 'Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency', *Food Chemistry*, 154, pp. 44–51.
- Quirós, C., Herrero, M., García, L. A. y Díaz, M. (2009) 'Quantitative approach to determining the contribution of viable-but-nonculturable subpopulations to malolactic fermentation processes', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), pp. 2977–2981.
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R. y Morales, P. (2014) 'Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration', *International Journal of Food Microbiology*, 181, pp. 85–91.
- Radler, F. y Schütz, H. (1981) 'Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*', *Annual Meeting of the American Society of Enologists*, pp. 36–40.
- Rainieri, S. y Pretorius, I. S. (2000) 'Selection and improvement of wine yeasts', *Annals of Microbiology*, 50, pp. 15–31.
- Rankine, B. L. (1989) *Making good wine. A manual of winemaking practices for Australia and New Zealand*. Melbourne, Australia: Sun Books, p. 374.
- Rapp, A. y Mandery, H. (1986) 'Wine aroma', *Experientia*, 42, pp. 44–47.
- Rapp, A. y Versini, G. (1995) 'Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines', *Developments in Food Science*, 37(C), pp. 1659–1694.
- Rawsthorne, H. y Phister, T. G. (2006) 'A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices', *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), pp. 1–7.
- Renault, P., Coulon, J., Revel, G. De, Barbe, J. y Bely, M. (2015) 'Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement', *International Journal of Food Microbiology*, 207, pp. 40–48.
- Renault, P. E., Albertin, W. y Bely, M. (2013) 'An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), pp. 4105–4119.

- Ribeiro, T., Fernandes, C., Nunes, F. M., Filipe-Ribeiro, L. y Cosme, F. (2014) 'Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties', *Food Chemistry*, 159, pp. 47–54.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. (ed.) (2000) 'Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeasts', in *Handbook of Enology*. West Sussex, UK: John Wiley and Sons, pp. 1–49.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T. y Moutounet, M. (2002) 'Aggregation of grape seed tannins in model wine-Effect of wine polysaccharides', *Food Hydrocolloids*, 16(1), pp. 17–23.
- Robinson, J. (1994) *The Oxford Companion to wine*. Edited by J. Robinson. Oxford: Oxford University Press, p. 840.
- Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B. y Caballero, A. C. (2010) 'Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma', *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), pp. 19–25.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F. y Manzanares, P. (2003) 'Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 181–188.
- Romano, P. y Suzzi, G. (1993) 'Sulfur dioxide and wine microorganisms', in Fleet, G. H. (ed.) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, pp. 373–393.
- Romano, P., Capece, A. y Jespersen, L. (2006) 'Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts', in Querol A, F. G. (ed.) *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer, pp. 13–53.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. y Capece, A. (2003) 'Function of yeast species and strains in wine flavour', *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), pp. 169–180.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G. y Zironi, R. (1992) 'Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts', *Journal of Applied Bacteriology*, 73(2), pp. 126–130.
- Romero Cascales, I. (2008) *Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración*. Murcia: Universidad de Murcia.
- Routman, E. y Cheverud, J. (1994) 'A rapid method of scoring simple sequence repeat polymorphisms with agarose gel electrophoresis', *Mammalian Genome*, 5(3), pp. 187–188.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. y Guillamón, J. M. (2002) 'Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA.', *Microbiological Research*, 157(4), pp. 267–274.
- Sablayrolles, J. M. (2008) 'Fermented beverages: the example of winemaking', in Pandey, A., Larroche, C. & Soccol, C. R. (ed.) *Advances in Fermentation Technology*. New Delhi: Asiatech Publishers, pp. 322–347.
- Sablayrolles, J. M. y Barre, P. (1986) 'Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions oenologiques simulées', *Sciences des Aliments*, 6, pp. 373–383.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J. y Alexandre, H. (2012) 'Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts', *Food Microbiology*, 32(2), pp. 243–253.
- Salinas, F., Garrido, D., Ganga, A., Veliz, G. y Martínez, C. (2009) 'Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine', *Food Microbiology*, 26(3), pp. 328–332.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B. y Alexandre, H. (2013) 'Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*', *PLoS ONE*, 8(10), pp. 1–11.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A. y Guillamón, J. M. (2011) 'Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Microbiology*, 28(6), pp. 1155–1161.



## 2. INTRODUCCIÓN

- Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C. y Gutiérrez, A. R. (2005) 'Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation', *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), pp. 49–56.
- Santos, J. P., Arroyo, T., Aleixandre, M., Lozano, J., Sayago, I., García, M., Fernandez, M. J., Ares, L., Gutierrez, J., Cabellos, J. M., Gil, M. y Horriilo, M. C. (2004) 'A comparative study of sensor array and GC-MS: Application to Madrid wines characterization', *Sensors and Actuators*, 102(2), pp. 299–307.
- Schmitt, M. J. y Breinig, F. (2002) 'The viral killer system in yeast: From molecular biology to application', *FEMS Microbiology Reviews*, 26, pp. 257–276.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. y Casal, M. (2004) 'Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains', *FEMS Microbiology Letters*, 231(1), pp. 19–26.
- Schulthess, D. y Ettlinger, L. (1978) 'Influence of the concentration of branched chain amino acids on the formation of fusel alcohols', *Journal of the Institute of Brewing*, 84, pp. 240–243.
- Shinohara, T. (1985) 'Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines', *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(7), pp. 2211–2212.
- Slaninová, I., Šesták, S., Svoboda, A. y Farkaš, V. (2000) 'Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*', *Archives of Microbiology*, 173(4), pp. 245–252.
- Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H. y Henschke, P. a (2000) 'Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), pp. 21–30.
- Sonnleitner, B. y Kappeli, O. (1986) 'Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis', *Biotechnology and Bioengineering*, 28, pp. 927–937.
- Sosa, O. A., de Nadra, M. C. M. y Farías, M. E. (2008) 'Modification by glucose of the flocculent phenotype of a *Kloeckera apiculata* wine strain', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(8), pp. 851–857.
- Suárez Lepe, J. A. (1997) *Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega*. 1ª edición. Madrid: Mundi-Prensa, p. 269.
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M. y Zhao, Y. P. (2014) 'Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines', *Food Microbiology*, 44, pp. 15–23.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. y Pretorius, I. S. (2005) 'Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), pp. 139–173.
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A. y Brandam, C. (2014) 'Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), pp. 1959–1967.
- Takahashi, M. T., Ohta, T., Masaki, K., Mizuno, A. y Goto-Yamamoto, N. (2014) 'Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free wine by culture-dependent and -independent methods', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, pp. 569–575.
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. (2012) 'Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts.', *Journal of Applied Microbiology*, 112(2), pp. 302–315.
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M. y Blondin, B. (2013) 'Impact of nutrient imbalance on wine alcoholic fermentations: nitrogen excess enhances yeast cell death in lipid-limited must', *PLoS ONE*, 8(4), pp. 1–11.
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H. y Remize, F. (2009) 'Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine', *International Journal of Food Microbiology*, 129(3), pp. 237–243.

- Thornton, R. J. (1991) 'Wine Yeast Research in New-Zealand and Australia', *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4), pp. 327–345.
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M. y Mas, A. (2001) 'Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years', *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(3–4), pp. 345–352.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G. y Grieco, F. (2013) 'Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy', *Food Microbiology*, 36(2), pp. 335–342.
- Ugliano, M. y Henschke, P. A. (2009) 'Yeasts and wine flavour', in Moreno-Arribas MV, P. M. (ed.) *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer Science Business, pp. 313–192.
- Urashima, T., Saito, T., Nakamura, T. y Messer, M. (2001) 'Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals', *Glycoconjugate Journal*, 18(5), pp. 357–371.
- Vallano, M. y Chaya, C. (2017) 'Tipos de pruebas de análisis sensorial', in Cordero-Bueso, G. (ed.) *Análisis sensorial de los alimentos*. 1 ed. Madrid: AMV Ediciones, pp. 155–184.
- Var, I., Erginkaya, Z. y Kabak, B. (2009) 'Reduction of ochratoxin A levels in white wine by yeast treatments', *Journal of the Institute of Brewing*, 115(1), pp. 30–34.
- Vaudano, E. y Garcia-Moruno, E. (2008) 'Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis', *Food Microbiology*, 25(1), pp. 56–64.
- Vaughan-Martini, A. y Martini, A. (1995) 'Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism', *Journal of Industrial Microbiology*, 14(6), pp. 514–522.
- Vernhet, A., Pellerin, P., Prieur, C., Osmianski, J. y Moutounet, M. (1996) 'Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions.', *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, pp. 25–29.
- Versini, G., Orriol, A. y Dalla, A. (1994) 'Aroma component of Galician Albariño, Loureira and Godello wines', *Vitis*, 33, pp. 165–170.
- Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S. y Manzanares, P. (2009) 'Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*', *International Journal of Food Microbiology*, 135(1), pp. 68–74.
- Vidal, S., Doco, T., Moutounet, M. y Pellerin, P. (2000) 'Soluble polysaccharide content at initial time of experimental must preparation', *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), pp. 115–121.
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V. y Waters, E. (2004) 'The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium', *Food Chemistry*, 85(4), pp. 519–525.
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M. y Pellerin, P. (2003) 'The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization', *Carbohydrate Polymers*, 54(4), pp. 439–447.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A. y Pellerin, P. (2001) 'Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides', *Carbohydrate Polymers*, 45(4), pp. 315–323.
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-Van der Vegte, W. H. y Van Dijken, J. P. (1990) 'Oxygen requirements of yeasts', *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), pp. 3785–3792.
- Walker, G. M. y Birch, R. M. (1998) 'Environmental stress responses in industrial yeasts', in *Proceedings of the Fifth Aviemore Conference on Malting, Brewing and Distilling*. London, UK: Institute of Brewing, pp. 195–199.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B. y Mas, A. (2014) 'Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization', *International Journal of Food Microbiology*, 191, pp. 1–9.

- Wang, C., Mas, A. y Esteve-Zarzoso, B. (2015) 'Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 206, pp. 67–74.
- Wang, C., Mas, A. y Esteve-Zarzoso, B. (2016) 'The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific', *Frontiers in Microbiology*, 7:502.
- Waters, E. J., Pellerin, P. y Brillouet, J. M. (1994) 'A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze', *Carbohydrate Polymers*, 23(3), pp. 185–191.
- Waters, E. J., Wallace, W., Tate, M. E. y Williams, P. J. (1993) 'Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine', *Food Chemistry*, 41, pp. 724–730.
- Weldegergis, B. T., De Villiers, A. y Crouch, A. M. (2011) 'Chemometric investigation of the volatile content of young South African wines', *Food Chemistry*, 128(4), pp. 1100–1109.
- Whitener, M. E. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M. y Vrhovsek, U. (2017) 'Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), pp. 179–192.
- Wilhelm, J. y Pingoud, A. (2003) 'Real-Time Polymerase Chain Reaction', *ChemBioChem*, 4(11), pp. 1120–1128.
- Willenburg, E. y Divol, B. (2012) 'Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine', *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), pp. 131–136.
- Williams, K. M., Liu, P. y Fay, J. C. (2015) 'Evolution of ecological dominance of yeast species in high-sugar environments', *Evolution*, 69(8), pp. 2079–2093.
- Winterhalter, P., Sefton, M. A. y Williams, P. J. (1990) 'Volatile C13-norisoprenoid compounds in riesling wine are generated from multiple precursors', *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, pp. 277–283.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I. y Gírio, F. (2006) 'Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations', *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), pp. 376–384.
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F. y Comi, G. (1993) 'Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*', *Biotechnology Letters*, 15(3), pp. 235–238.
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. y Nury, F. S. (2001) *Análisis y producción del vino*. Zaragoza, Spain: Acribia, S.A.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A. y Masneuf-Pomarede, I. (2010) 'Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR', *Food Microbiology*, 27(5), pp. 559–567.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3.1. Non- <i>Saccharomyces</i> Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production .....	111
3.2. The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates .....	137
3.3. Use of native non- <i>Saccharomyces</i> strain: a new strategy in D.O. “Vinos de Madrid” (Spain) wines elaboration.....	159
3.4. Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential Fermentations Made by Native Strains from D.O. “Vinos de Madrid” Using Real Time Quantitative PCR.....	187
3.5. Polysaccharides and Oligosaccharides Produced on Malvar Wines Elaborated with <i>Torulaspora delbrueckii</i> CLI 918 and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CLI 889 Native Yeasts from D.O. “Vinos de Madrid” .....	207

### **3.1. Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production**

García, M., Esteve-Zarzoso, B. y Arroyo, T.

Publicado en:

In Morata, A., Loira, I. (ed.) Grape and Wine  
Biotechnology. InTech, Croatia. 2016, pp. 249–272

doi: 10.5772/64957

#### **Levaduras no-*Saccharomyces*: Papel biotecnológico en la producción del vino**

##### **RESUMEN**

Las levaduras no-*Saccharomyces* juegan un papel importante en las primeras etapas de la fermentación del vino. Con el incremento en la concentración de alcohol, las cepas de levaduras nativas o comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* toman el control de la fermentación y completan la transformación de los azúcares del mosto en etanol, CO<sub>2</sub> y otros metabolitos secundarios. La presencia de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación tiene un impacto en la composición del vino, y, por lo tanto, su contribución al vino no puede ser ignorada. Los nuevos retos propuestos para aumentar el atractivo y la calidad de los vinos elaborados por métodos tradicionales están siendo alcanzados por la selección y el uso de cepas de levaduras autóctonas no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* que realzan la identidad regional de los vinos. Gracias al mejor entendimiento actual de la bioquímica y fisiología se ha permitido la selección y el desarrollo de nuevas cepas de levaduras que tienen una influencia específica en la eficiencia del proceso fermentativo y en la calidad del vino. El objetivo de este capítulo ha sido mostrar los diferentes aspectos de las levaduras no-*Saccharomyces* que pueden tener una incidencia positiva en el proceso biotecnológico que conduce a la elaboración del vino.

**Contribución personal al manuscrito:** Yo he participado en la búsqueda bibliográfica y en la redacción del presente capítulo.

## Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production

Margarita García, Braulio Esteve-Zarzoso and Teresa Arroyo

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/64957>

### Abstract

Non-*Saccharomyces* yeasts play a substantial role in the early stages of wine fermentation. With the increase in alcohol concentration, indigenous or commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* take over and complete the transformation of the grape must sugars into ethanol, CO<sub>2</sub>, and other secondary metabolites. The presence of non-*Saccharomyces* during the fermentation has an impact on the wine composition, and consequently, their contribution during the fermentation process cannot be ignored. The new challenges to enhance the appeal and value of wine elaborated by traditional technology are being achieved by selecting and using autochthonous non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* strains that may enhance regional identity of wines. Greater understanding of yeast biochemistry and physiology is enabling the selection and development of yeast strains that have defined specific influences on process efficiency and wine quality. The aim of this chapter was to show the different aspects of non-*Saccharomyces* species that may play a positive incidence in the biotechnological process to conduct to wine elaboration.

**Keywords:** non-*Saccharomyces* yeast, wine production, aroma, enzymes, mixed culture

### 1. Introduction

Since 1866 when Louis Pasteur first elucidated the bioconversion of grape juice into wine, this complex biochemical process and the role of the yeast therein have been studied continuously. *Saccharomyces cerevisiae* has often been the wine yeast that has received the most attention in the wine elaboration. This yeast is not only related with the conversion of grape sugar into

alcohol and CO<sub>2</sub> in the fermentation process which also plays an important role in the generation of secondary metabolites, just as the production of varietal wine aromas from grape aroma precursors [1]. The spontaneous fermentation of the wine is produced by a mixture of yeast species simultaneously present in the grape must [2]. Although the control of *S. cerevisiae* (inoculated or native) in the fermentation is predicted and desired, the presence of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts in the must leads to a competitive situation for the nutrients contained in the must. These non-*Saccharomyces* yeasts are perfectly adapted to the specific environment and frequently are in greater number of *S. cerevisiae* [3].

Yeast and bacterial microbial dynamics have been studied since the 1970s [4]. Using classical methods, microbial count and diversity is determined by employing synthetic culture media containing agar. The biodiversity in the complex ecosystems is impossible to characterize with precision using classical microbiological culture-dependent methods. When using enrichment methods and growth on culture medium, the microbiota naturally present in the sample are open to undergo important changes because of the ability of the certain species take control of the system and overcome other microbial components [5]. Due to this, populations less numerous or sensitive to the stress conditions are hard to find again and identify. Therefore, the use of culture-dependant methods could cause a misidentification of the microbial ecology of complex ecosystems [6].

Since the end of the 1990s, molecular techniques have helped provide a good overview of microbial ecology. These methods, generally named culture-independent methods, are used for the identification of microorganisms directly in the system through the study of their DNA and RNA without the need for isolation and cultivation. There are several advantages of the direct characterization of wine microbial DNA against to culture-dependent methods. Firstly, not all microbial populations are able to grow in enrichment media due to injury, lack of appropriate nutrients, or presence of viable but not culturable states. Secondly, the direct analyses allow saving time in comparison with the enrichment methods. This advantage could enable winemakers to use microbial detection data during the fermentation process, being able to anticipate possible spoilage problems in the wine. Furthermore, the DNA-based studies allow processing a larger numbers of samples than plating methods [7].

Nevertheless, in the past few years, successful culture-independent methods such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), real-time PCR, fluorescence in situ hybridization (FISH), or Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) have been described. The PCR-DGGE method was first developed for the study of the microbial ecology in the environmental samples but soon found application in food microbiology [8]. This method is based on the separation of same length DNA fragments, but of different sequences. PCR-DGGE method has reported detection limits between 10<sup>2</sup> CFU/mL in pure cultures and 10<sup>4</sup> CFU/mL in wine or must samples [9].

In recent years, scientists have used real-time quantitative PCR (QPCR) to detect and quantify microorganisms in different alimentary environments [10]. The advantages of QPCR are the low detection level, often as low as one cell per mL, the speed by which assays are performed, and the ability to quantify yeasts present following alcoholic fermentation.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a very promising technique for wine ecology studies for its simplicity and rapidity as well as the ability to observe the cell morphology by a microscope and the high sensitivity obtained using a flow cytometer [11].

Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy is used to identify isolates according to the different components of the cell [12]. The relative success of this method is directly dependent on the complexity within a reference spectral library, identification results on genus and species level. Due to high automation and cost efficiency, this high-throughput method gives much deeper insights into functional yeast diversity during wine production.

Fortunately, DNA-based approaches have largely helped to clarify modern taxonomy. DNA sequence analysis is now widely used in the identification and classification of yeasts and other fungi therefore helping to reassign species within genus level because of the new species that are now discovered [13]. In food and beverage industry, these name changes influence our ability to notify the identity of spoilage microorganisms and to be in accordance with the regulations governing the presence of certain microorganisms in this industry. Current taxonomies recognize 149 yeast genera comprising nearly 1500 species [14]. Of these, more than 40 species have been isolated from grape must [15].

## 2. Use of non-Saccharomyces yeasts in the wine production

Non-Saccharomyces yeasts were originally seen as responsible for microbial spoilage in wine production due to their isolation from spoiled wines [16]. Traditionally, the use of non-Saccharomyces in the wine elaboration has not been usual due to preceding investigations showed that several species produce high levels of undesirable compounds that affect the wine quality such as acetoin, ethyl acetate, acetic acid, and acetaldehyde [17]. Unfortunately, this exclusion of non-Saccharomyces yeasts from the fermentation process may result in a loss of complexity and wines lacking distinctive characteristics.

The initial belief that all non-Saccharomyces yeasts died soon after the commencement of an alcoholic fermentation due to the rising ethanol concentration and added SO<sub>2</sub> has not been sustained by later research [18]. Currently, the cellar technology and hygiene in modern cellars have improved greatly; as a consequence of this, the use of SO<sub>2</sub> has been significantly reduced. For these reasons, the survival of a higher number and diversity of non-Saccharomyces yeasts has increased. The great number of non-Saccharomyces yeasts reported in recent literature has also been influenced for the use of modern laboratory techniques that have made the detection of non-Saccharomyces yeasts easier [19].

During fermentation, and more evident in spontaneous fermentations, which lack the initial high-density inoculum of *S. cerevisiae*, there is a sequential succession of yeasts. Initially, species of *Hanseniaspora* (Kloeckera), *Rhodotorula*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, and *Cryptococcus* are found at low levels in fresh must [20]. Of these, the most common yeast present in the highest numbers is *Hanseniaspora uvarum*, followed by different *Candida* spp. This is normally more

evident in red must than white, probably as a result of the higher pH in red wine. However, *Hanseniaspora* may sometimes be absent or present at low levels [15].

Despite the sustained presence of certain non-*Saccharomyces* yeasts, the majority are not possible to recovery on plates during the early stages of a vigorous fermentation. This might be due to their slow growth and inhibition by the combined effects of SO<sub>2</sub>, pH, increase in ethanol and oxygen deficiency [21]. This is consistent with their oxidative or weak fermentative metabolism. Nutrient limitation and size or dominance of *S. cerevisiae* inoculum can also have a suppressive effect, sometimes separate from temperature or ethanol concentration [22]. It has been reported that *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* are less tolerant to low oxygen levels, and this, rather than ethanol toxicity, affects their growth and leads to their death during fermentation [23]. It was also shown that a cell-cell contact mechanism in the presence of high concentrations of viable *S. cerevisiae* yeasts played a role in the inhibition of these two non-*Saccharomyces* species [24]. But these mechanisms are not corroborated by Pérez-Nevado et al. [25] and Wang et al. [26]. Both authors were able to show that some metabolites produced by *S. cerevisiae* may be the responsible of the inhibitory effect on the growth of non-*Saccharomyces* wine yeasts. Recently, Branco et al. [27] showed that one derived peptide of the GAPDH could be the responsible of this inhibitory effect.

Species	Metabolites and/or physical properties	References
<i>Candida stellata</i> or <i>Starmerella bacillaris</i> (formerly <i>Candida zemplinina</i> )	Acetic acid	[9, 35, 42, 43]
	Dodecanoic acid	
	Ethyl octanoate	
	Glycerol	
	Higher alcohols	
	2-Methyl propanoic acid	
	Succinic acid	
	Terpenoids	
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> (formerly <i>Debaryomyces vanrijii</i> )	Esters	[44]
	Medium-chain fatty acids	
	Terpenoids	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Acetate and ethyl esters	[9, 47]
	Sulfur compounds	
	Higher alcohols	
	Medium-chain fatty acids	
<i>Hanseniaspora vineae</i>	2-Phenylethyl acetate	[48]
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Acetate and ethyl esters	[47]
	Acetone	
	Heavy sulfur compounds	
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Ethyl acetate	[49, 50]



Species	Metabolites and/or physical properties	References
	Ethyl lactate	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (formerly <i>Pichia anomala</i> )	Acetate and ethyl esters Higher alcohols	[37, 50, 51]
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Color Methanol	[41]
<i>Lachancea thermotolerans</i> (formerly <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> )	Glycerol Lactic acid 2-Phenylethanol	[17, 38]
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Esters	[35, 46]
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (formerly <i>Pichia guilliermondii</i> )	Color	[53]
<i>Pichia kluyveri</i>	Thiols	[52]
<i>Pichia fermentans</i>	Acetaldehyde 2,3-Butanediol Ethyl esters Higher alcohols Polysaccharides	[29, 49]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Malolcoholic deacidification Pyruvic acid Color Propanol	[39, 40]
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Succinic acid Linalool Polysaccharides	[35–37, 66]
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Polysaccharides	[49]
<i>Zygosaccharomyces florentina</i> (formerly <i>Zygosaccharomyces florentinus</i> )	Polysaccharides	[50]

**Table 1.** Metabolites produced and/or physical properties enhanced in wines fermented with non-conventional yeasts as single or co-fermentations compared with pure fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*.

The non-*Saccharomyces* yeasts have an important influence on wine flavor depending of species and strain specific involved in the fermentation process. These yeasts present particular metabolic features that affect to the organoleptic characteristics in the wine including the capacity to secrete enzymes and metabolites related with the primary and secondary aroma of wines, low volatile acidity, release of mannoproteins, or increase in wine color stability [28]. Should be note their potential positive contributions to wine quality, while keeping fermentation kinetics and consistency under control, many researchers have postulated co-inoculation or sequential inoculation of *S. cerevisiae* or closely related species with one or more non-*Saccharomyces* strains (Table 1).

### 3. Influence of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed fermentations

In recent years, re-evaluation of the role of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking has resulted in several studies that have looked at the use of controlled fermentations using *Saccharomyces* along with non-*Saccharomyces* yeast species from the winemaking [29, 30]. The mixed fermentations are used as a biotechnological tool in order to enhance especial and specific characteristics of a wine and thus improve their complexity. Indeed, the application of mixed and controlled fermentations in the wine elaboration has changed the standardized way to make wine and can improve the quality of the final product. These fermentations consist in controlled inoculations of *S. cerevisiae* starter culture and non-*Saccharomyces* strains. The non-*Saccharomyces* application could enhance the analytical composition of wine by taking advantages of diverse metabolic pathways of these yeasts.

The use of controlled mixed fermentations of non-*Saccharomyces* yeasts together with *S. cerevisiae* can be suggested as an useful tool for wine production which allows reproduce microbiological and technical aspects that really occur in the spontaneous fermentation, as well as an increase in the wine aroma complexity owing to a more complex synthesis of aromatic compounds [31]. This practice has also been reported as being able to increase some desirable metabolites, such as some acetate esters [32] and glycerol [33]. Moreover, some non-*Saccharomyces* yeasts have been reported as being able to release more polysaccharides than *S. cerevisiae* strains [34].

The influence of multistarter fermentation practices on final wine composition and on growth and death rates of the *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains have been investigated. *Torulaspora delbrueckii*, one of the few non-*Saccharomyces* yeast species currently commercialized, is reported to have a positive effect on the taste and aroma of alcoholic beverages [35] and exhibits low production of acetaldehyde, acetoin, acetate, and ethyl acetate [36].

Recent studies using strains of *T. delbrueckii* and *L. thermotolerans* as starter cultures together with *S. cerevisiae* (specifically in mixed and sequential fermentations) have generated important changes in the wine composition. *Torulaspora delbrueckii* produced a reduction in acetic acid content and *L. thermotolerans* produced a reduction in acetaldehyde concentration and increase in titratable acidity [37, 38].

Other studies have been carried out with the aim of de-acidifying the grape must or wine through malic acid degradation using mixed fermentations of *Schizosaccharomyces pombe* and *S. cerevisiae*; some species of *S. pombe* had been recognized to improve some of sensory parameters of the wine, especially those related to wine color stability due to the correlation between the amount of pyruvic acid released into the medium and the formation of vitisin A (a pyranoanthocyanin, natural polyphenol, found in grapes) [39, 40]. *Issatchenkia orientalis* is one of the indigenous yeasts present in the wine. The strain KMBL 5774 of *I. orientalis* isolated from Korean wine pomace can degrade malic acid thus could be important in decreasing malic acid content in the wine and be useful the wine industry by this attribute [41].

The use of *Starmerella bacillaris* (formerly *Candida stellata*) yeast in mixed fermentation with *S. cerevisiae* starter cultures has been widely investigated these last few years, and several studies

have shown an increase in glycerol content in mixed wines. Glycerol is related with the mouthfeel and complexity of wine flavor. The analytical and organoleptic profile of the wine was improved without any negative analytical profile in the fermentation of grape musts with mixed fermentations of *S. bacillaris* and *S. cerevisiae* starter strains. Also, it has been observed that the inoculation of grape must with pure cultures of *S. bacillaris* can result in the production of high concentrations of acetaldehyde and acetoin [42, 43]. In fact, in comparison with *S. cerevisiae* inoculated fermentations, the use of co-fermentations (mixed or sequential inoculations), continuous fermentation, and immobilized cells can contribute the following: (1) complementary consumption of glucose and fructose; (2) enhanced glycerol and succinic acid concentrations; and (3) no increases in acetaldehyde and acetoin contents, due to the presence of the *S. bacillaris* based on the existence of acetaldehyde exchange between the two species without any increment in its levels. The practice of multistarter fermentation can also be used to improve the complexity of organoleptic properties of a wine contributing to the enjoyment of wine. Garcia et al. [44] were able to verify an increase in geraniol production in mixed cultures of *Debaryomyces vanriji* and *S. cerevisiae*. This enhancement was due to the high levels of  $\beta$ -glucosidase activity exhibited by this non-*Saccharomyces* strain.

Another non-*Saccharomyces* yeast with several interesting features from wine industry is *Metschnikowia pulcherrima*. This yeast is generally predominant during the initial stages of alcoholic fermentation and also shown some significant effect in wine composition. In particular, *M. pulcherrima* is a high producer of  $\beta$ -glucosidase [45], and its presence in mixed cultures can provide important improvements in the wine such as decrease in the volatile acidity and increase in the production of medium-chain fatty acids, higher alcohol, esters, terpenoids, and glycerol. Some authors have also reported that *M. pulcherrima* can produce a reduction in the titratable acidity of the final wines. Depending on the initial acidity level of the grape must, this effect could be taken positively or negatively. It has also been reported that *M. pulcherrima* has a higher capacity to release polysaccharides from yeast cell walls during fermentation process compared to *S. cerevisiae*. More recently, sequential fermentations with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* have shown that a reduction in ethanol concentration is occurring in this type of culture [46].

Yeasts belonging to the *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) genus are the non-*Saccharomyces* yeasts found in the highest numbers in grape must. Due to their ability to produce unpleasant compounds, such as acetic acid and ethyl acetate, these apiculate yeasts have long been considered as spoilage yeasts particularly during the early stages of wine fermentation. Mixed fermentation trials in presence of *H. uvarum* and *S. cerevisiae* starter cultures have presented increases in isoamyl acetate [47], while use of *Hanseniaspora osmophila* provides improvements in 2-phenylethyl acetate production [48–50]. According to a report by Kurita [51], mixed inoculations using *Wickerhamomyces anomalus* (formerly *Pichia anomala*) resulted in positive enhancement of isoamyl acetate. Higher concentrations in the varietal thiols have been shown in mixed fermentations with *S. cerevisiae* and another strain belonging to the *Pichia kluyveri* species [52].

Benito et al. [53] have studied the hydroxycinnamate decarboxylase (HCDC) activity of *Meyerozyma guilliermondii* (formerly *Pichia guilliermondii*) in mixed and sequential fermenta-

tions with *S. cerevisiae*. *Meyerozyma guilliermondii* with HCDC activity can be used to decarboxylate hydroxycinnamic acids and form vinylphenols that condense with grape anthocyanins to produce vinylphenolic pyranoanthocyanin adducts—molecules that show great color stability.

## 4. Highlights produced by non-*Saccharomyces* yeasts

### 4.1. Enzymes with oenological interest

Over the last several decades, the utilization of enzymes has become more important in winemaking. Enzymatic treatments of grapes, musts, and wines are nowadays useful for multiple positive aims, reduction of times maceration, clarification and filtration, increase in free and press juice yields, improvements in color and aroma extraction as well as wine stability [54]. The enzymes are proteins usually produced by bacteria or by filamentous fungi [55]. These proteins are very valuable tools for the winemakers; they now strengthen the use of endogenous enzymes over commercial exogenous enzymes. The production of extracellular hydrolytic enzymes by indigenous yeast could be notable and a better understanding to their benefit of wine production is required. Moreover, wine yeast has a decisive role in the production of commercial enzymes to be used in the wine elaboration process [56]. The principal wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, is not notable as a significant producer of extracellular enzymes, although some strains have been mentioned to degrade polygalacturonate [57].

On the contrary than *Saccharomyces* species, the non-*Saccharomyces* yeasts produce and secrete several enzymes as well as esterases, glycosidases, lipases,  $\beta$ -glucosidases, proteases, cellulases, etc., to the periplasmic space and the medium, where they have the capacity to bind with grape precursors compounds to produce aroma active compounds and thus play an important role in varietal aroma and flavor profiles [58].

Terpenoids, fatty acid esters, higher alcohols, glycerol, acetaldehyde, acetic acid, and succinic acid are some metabolic products generated from non-*Saccharomyces* growth. There is a distinction in types of flavors according to their origin, the primary flavor of wine comes naturally from grapes, each grape variety offers a unique set of aromas and flavors, and the fermentation process creates a group of bouquets that are commonly referred to secondary flavor [59]. Several flavor and aroma compounds are present in grapes as glycosidic precursors without sensory properties. The  $\beta$ -glucosidase enzyme might hydrolyze these compounds to form free volatiles increasing the flavor and aroma of wine and contributing to the higher fruit-like characteristic of final product; this enzyme is not encoded by the *S. cerevisiae* genome [60]. Instead, certain non-*Saccharomyces* genera as *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, and *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) have different degrees of  $\beta$ -glucosidase activity which can have on the sensory character of wines [61].

Proteolytic and pectinolytic (polygalacturonase) are other extracellular enzymatic activities produced by non-*Saccharomyces* yeasts which may also be beneficial to winemaking. For



example, proteolytic activity of some non-*Saccharomyces* yeast reduces the protein concentration of the grape juice by approximately one-third with accompanying increase in protein stability of the final product. The protein haze reduction is one of most significant changes for alcoholic beverages manufacturers. Protein precipitation in bottled wines especially in whites and red with low amounts of polyphenols causes protein haze where a coagulation of proteins occurs in alcoholic beverage with unfavorable storage conditions. These denatured proteins can either flocculate into a hazy suspension or form sediments in bottle [62]. Species found to produce the greatest number of extracellular enzymes are *C. stellata*, *H. uvarum*, and *M. pulcherrima* [56].

Non-*Saccharomyces* yeasts have also been reported to affect the concentration of polysaccharides in wine [49]. An enzymatic degradation happens in the dead yeast cells; the cells components such as proteins, nucleic acids, and lipids are broken down into smaller compounds as amino acids, peptides, fatty acids and nucleotides and also occur in releasing soluble polysaccharides (mannoproteins) from the cell wall. Most of these products have flavor impact or flavor-enhancing potential [63], but their specific contributions to wine character require more focused research and will depend on the extent to which the wine is exposed to the lees [64]. Moreover, there is evidence that peptides released during yeast autolysis could have antioxidant and other bioactive properties. Polysaccharides improve the sensory properties in wines, as they can positively influence mouthfeel (texture) by increasing its viscosity and mouth-filling [65]. Some non-*Saccharomyces* yeasts die in the early stages of fermentation process and they can also be a nutrient source that *S. cerevisiae* used to ferment optimally. Charoenchai et al. [58] reported the effect of nitrogen sources on the production of extracellular proteases by non-*Saccharomyces* wine yeasts. From 26 yeast strains, protease activity was observed in strains of *M. pulcherrima*, *Kloeckera apiculata*, and *W. anomalus*. Also, *T. delbrueckii* has reported as releasing higher amount of polysaccharides, Gonzalez-Royo et al. [66] have found that the high content of polysaccharides obtained by sequential culture with *T. delbrueckii* has a positive effect on the foam properties in sparkling wines.

The role of pectinases in winemaking has been evaluated by Canal-Llaubères [67]. Some of the applications in mash treatment are to improve juice extraction, clarification process, filterability, and also color extraction. The use of pectolytic enzymes for maceration may also accelerate the extraction of phenolic compounds, reducing the maceration time needed for high quality of wine [68]. The addition of fungal pectinase preparations is a normal practice in wine industry even though pectin esterase and polygalacturonase enzymatic activities increase during grape ripening and are produced by non-*Saccharomyces* yeasts present in must.

The accumulation of esters in wine is known to be a result of the balance between the yeast's ester-synthesizing enzymes and hydrolysis reactions involving esterases (responsible for cleavage and in some cases, formation of ester bonds). The production of extracellular esterases in *Saccharomyces* wine yeasts is well known [69], but the situation for non-*Saccharomyces* needs further investigation. Yeast esterases studied include those of the genus *Brettanomyces* [70] and *Rhodotorula mucilaginosa* [71]. Also, one strain of *Debaryomyces hansenii* has been reported as producing strain of an esterase enzyme [72].

The lipids proceeding from the grape or from autolytic activity of yeasts can be degraded by lipases. After this enzymatic reaction, free fatty acids would be released into the juice or wine, which can lead to changes in wine quality. While properties of lipoxygenase and peroxide-cleaving enzymes from grapes have been well established [73], the knowledge about lipase enzyme production by non-*Saccharomyces* yeasts is not well documented yet. Ratledge and Tan [74] reported data about the production of extracellular lipases by yeasts, only a single species of *Yarrowia lipolytica* (formerly *Candida lipolytica*) and *Saccharomycopsis lipolytica*.

*Hanseniaspora* and *Torulaspora* genera are reported as good producers of enzymes such as  $\beta$ -glucosidases, pectinases, proteases, and those involved in xylan degradation [58, 75]. However, the secretion of each enzyme is not characteristic of a particular genus or species, but depends on the yeast strain analyzed [76].

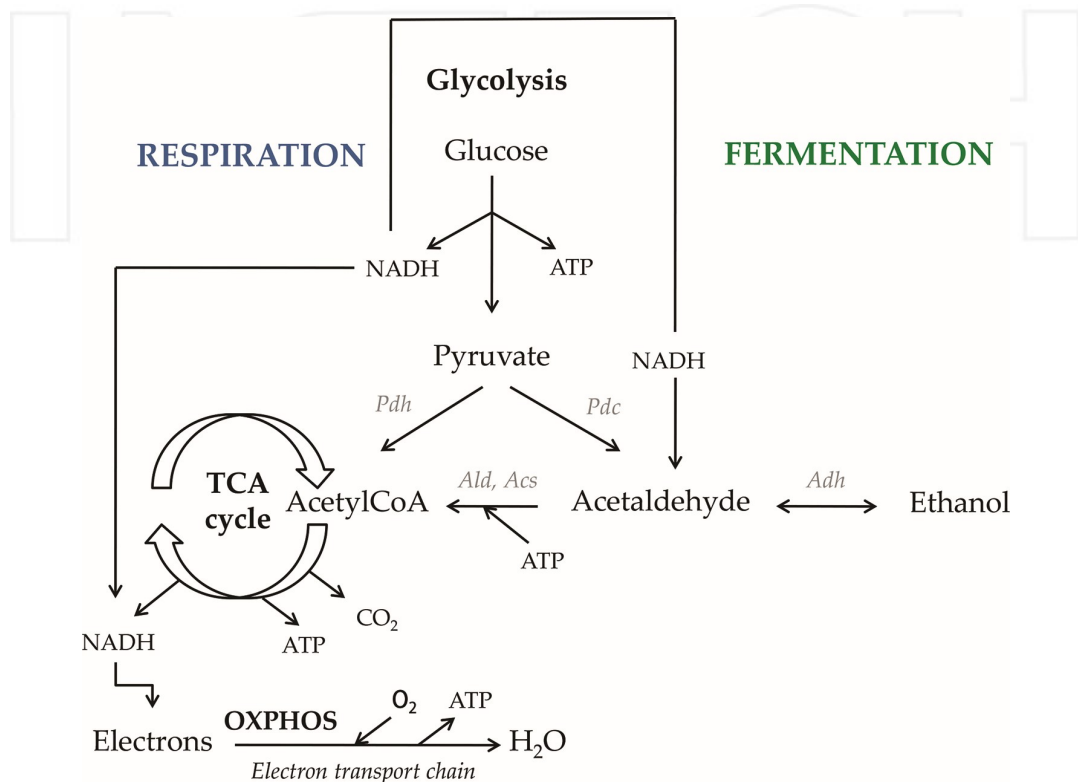
#### 4.2. Use of lower ethanol efficiency yeasts

In recent decades, the increasing alcohol level in wine is one of the most important challenges facing in the enological industry. The problem is related in part to global warming, which results in modifications of fruit maturation patterns, as well as a lack of balance between sugar accumulation and the phenolic ripeness of berries [77]. Fermentations with higher initial sugar content combined with high final ethanol concentration may have impact on microbiological, technological, sensorial, and financial aspects of winemaking. Higher sugar level delivers shifts in alcohol, altering flavors and mouthfeel. Musts with higher sugar concentrations cause a stress response in yeast leading to an increased formation of fermentation co-products, such as acetic acid. Also, this increasing sugar content leads to delay harvest period so as to insure appropriate aromatic and phenolic maturity. On the commercial side, excess ethanol can get worse sensory quality of wine, discourage consumers, because of the health effects associated with the excessive alcohol consumption or become a drawback in the global market, due to regulations and taxes associated with the alcohol content of beverages. All these reasons stimulate the creation of strategies directed to reduce alcohol level in wine.

Researchers, engineers, and oenologists are working together to develop approaches to limit ethanol content of wines, targeting almost all the steps in the production cycle [78], including among other examples, grapevine clonal selection, vineyard management, winemaking practices adapted to unripe grapes [79], use of lower ethanol efficiency yeast strains [80] or metabolic inhibitors [81] and partial dealcoholization by physical means [82]. While some of these technologies are still in need of fundamental research, others are in several stages of regulatory support and implementation by the industry.

The development of low-alcohol yeasts is a current challenge in wine industry. During the last years, researchers have been investigating *S. cerevisiae* metabolism to reduce the yield ethanol/sugar consumed. Two approaches were used as follows: metabolic engineering strategies diverting sugar metabolism towards products other than ethanol [Genetically Modified Organisms (GMO) strategy] [83] and more recently an adaptive evolution-based strategy [84]. An alternative to these approaches is to select low-ethanol producers in *S. cerevisiae* species by screening wild yeast population or to use breeding strategies.

Given the vast potential for diverse wine relevant phenotypes among non-*Saccharomyces* yeast, it has been proposed that strains able to utilize oxygen grape sugars could be used to decrease ethanol concentration in wine [85]. Unlike *S. cerevisiae*, which favors fermentative metabolism over aerobic respiration when sugar concentration exceeds 10 g/L (due to the Crabtree effect), many non-*Saccharomyces* yeast are able to use oxygen for growth regardless of sugar concentration and thus divert carbon into other metabolites and therefore away from ethanol formation.



**Figure 1.** Yeast energy metabolism.

Respiration and fermentation are two pathways for ATP production from glucose used by yeasts. Both pathways start with glycolysis, the major process for sugar degradation where the breakage of one glucose molecule results in the production of two molecules of pyruvate and ATP. In fermentation, pyruvate is finally transformed into ethanol by pyruvate decarboxylase (*Pdc*) and alcohol dehydrogenase (*Adh*) enzymes. This process does not produce additional ATP but the NADH that is released in glycolysis is recycled by *Adh* into NAD<sup>+</sup>, and thus, alcoholic fermentation can occur in the absence of oxygen. In respiration, pyruvate is transformed into acetyl-coenzyme A by pyruvate dehydrogenase (*Pdh*) which is then oxidized to CO<sub>2</sub> through the TCA cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS), where it yields additional ATP but requires oxygen. At abundant levels of sugars and oxygen, Crabtree-positive yeasts use fermentation and respiration simultaneously. Once glucose has been depleted in the environment, one way to generate ATP is recycling the ethanol accumulated.

This process causes a loss in terms of ATP because of the conversion of ethanol to acetyl-CoA carried out by aldehyde dehydrogenase (*Ald*) and acetyl-CoA synthetase (*Acs*) requires one additional ATP per ethanol recycled (**Figure 1**).

Yeasts can be classified depending on the way they regulate their respiro-fermentative metabolism. Crabtree-positive yeasts could ferment under aerobic conditions only if sugar concentration is above certain thresholds. The prime example of Crabtree-positive species is *S. cerevisiae*, yeast with clear preference towards fermentative metabolism. This Crabtree-positive character has allowed to *S. cerevisiae* adapt in sugar rich environments [86]. In contrast, the extent of fermentative metabolism for Crabtree-negative species would be very limited whenever enough oxygen is available [87]. *Hanseniaspora uvarum* and *Candida utilis* are examples of Crabtree-negative yeasts [88]. In spite of his preference for respiratory metabolism, some Crabtree-negative yeasts, such as *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*, can grow in the absence of oxygen [89]. Finally, some yeast species are not able to ferment sugars and are obligate aerobes.

It is thought that redox balance in the metabolism of sugars generates the production of metabolic by-products as acetic acid, ethanol, and glycerol. In recent years, it is trying to take the control of metabolic systems in order to redirect carbon flux towards desirable compounds release, for example, glycerol overproduction. An added benefit of this approach is that enhanced glycerol concentrations can have a favorable influence on wine by enhancing its sweetness, smoothness, and overall body [90].

Several yeast strains, including *M. pulcherrima*, *K. lactis*, and *Candida sake* isolates, were found to be good candidates to develop fermentation procedures aiming at reducing alcohol content in wine by respiration. Results of previous work also indicated that, besides the study of yeast ability in sugar respiration metabolism under aerated winemaking conditions, it is necessary to find a compromise between ethanol yield, acetic acid production, and growth performance in grape must. Differences of up to one order of magnitude in acetic acid yield were found among the different yeast strains studied [91].

#### 4.3. Bioprotection by non-*Saccharomyces* yeasts

Vinification process is composed by different and delicate steps as growing, harvesting, fermentation, and aging and storage in the winery. Unsuitable precautions or poor practice during any of these steps can lead to growth of wine spoilage organisms and consequent production losses. The major microorganisms involved in wine spoilage are acetic acid bacteria from genera *Acetobacter*, *Gluconobacter*, and lactic acid bacteria from *Leuconostoc*, *Lactobacilli*, and *Pediococcus* genera [92], whereas the yeasts involved in wine spoilage mainly are from genera *Dekkera/Brettanomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, and *Candida*, usually isolated from wines with aroma defects [93]. Bacterial wine spoilage imparts mousy taint, bitterness, geranium notes, volatile acidity, oily and slimy-texture, and overt buttery characters to the wine [92], whereas the common spoilage effects due to yeasts are off odors, off-tastes, film formation, cloudiness or haziness, sediments, and gas production in bottled wines [93].



Traditionally, sulfur dioxide (as potassium metabisulphite), sorbic acid, fumaric acid, and dimethyl dicarbonate (DMDC) are used for preservation of different wines in various countries. Due to these drawbacks and growing consumer bias against chemical preservatives, research efforts are directed towards use of different physical methods and exploitation of natural antimicrobial compounds obtained from plants, animals, and microorganisms for wine preservation. Many studies have demonstrated the potential of natural products such as hydroxycinnamates and organic acids [94], chitosan [95], nisin [96], lysozyme [97], antimicrobial peptides [98], killer toxins [99], natamycin [100],  $\beta$ -glucanases [101], bovine lactoferrin-derived peptides [102], carvacrol and thymol [103], and vitamin K5 [104] for the control of wine spoilage yeasts and bacteria.

One of the biological mechanisms for the regulation of population dynamics in several microbial ecosystems is the production of toxins capable of kill or inhibit other microorganisms, taxonomically related or not to the producing strains. The toxins synthesized by yeasts, known as killer factor, are proteins or glycoproteins whose action is mediated by specific receptors in the cell wall of the sensitive microorganism. The killer character, first reported on the decade of the 1960s in a *S. cerevisiae* strain, is well distributed among other yeast genera as *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Ustilago*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Kluyveromyces*, and *Zygosaccharomyces* [105].

*Saccharomyces cerevisiae*'s killer toxins and their relevance in winemaking have been thoroughly investigated in the literature. However, these killer toxins exhibit narrow spectra of activity limited to the other strains of *S. cerevisiae* [106] except for the Klus killer toxin and the killer toxin from *S. cerevisiae* strain Y500-4 L that are active against a few non-*Saccharomyces* species and are therefore unsuitable as agents to prevent the development of spoilage yeasts. Therefore, the differences in stationary phase cell concentrations between yeast species in wine fermentations may be due to the fact that the non-*Saccharomyces* yeasts are more sensitive to certain growth-inhibitory compounds than *S. cerevisiae*.

The killer toxins secreted by the yeast species *Pichia membranifaciens*, *Kluyveromyces wickerhamii*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Wickerhamomyces anomalus* (formerly *Pichia anomala*) and the filamentous fungus *Ustilago maydis* have been specifically investigated for their killer activity against *Brettanomyces bruxellensis* [107]. These killer toxins successfully inhibited the growth of *B. bruxellensis* in wine and grape juice. Furthermore, the killing activity of certain non-*Saccharomyces* killer toxins has been demonstrated against the apiculate yeast *Hanseniaspora uvarum* [108] and also against the grapevine pathogen *Botrytis cinerea* [109].

## 5. Concluding remarks

Strain selection is of key importance, as not all strains within a species will necessarily show the same desirable characteristics [110]. The accepted list of desirable characteristics as pertaining to the wine yeast *S. cerevisiae* will not necessarily apply to non-*Saccharomyces* yeasts. These wine yeasts will necessarily have a different list of desired characteristics. Thorough briefings and assistance of wine producers will have to accompany any new non-*Saccharomyces*

technology for wine production. However, the aims submitted by Pretorius et al. [111] and other authors advocate the use of selected non-*Saccharomyces* yeasts as able to consume grape juice sugars, enhance production of desirable volatile esters, enhance liberation of grape terpenoids, and produce glycerol to improve wine flavor and other sensory properties. A modern approach to multispecies inoculations backed by science and rigorous research is essential to help winemakers achieve their primary objective of attaining conversion of grape sugar to alcohol and carbon dioxide, at a controlled rate and without the development of off-flavors.

### Author details

Margarita García<sup>1\*</sup>, Braulio Esteve-Zarzoso<sup>2</sup> and Teresa Arroyo<sup>1</sup>

\*Address all correspondence to: margarita\_garcia\_garcia@madrid.org

1 Agroalimentary Department, Madrid Institute for Research and Rural Development in Food and Agriculture (IMIDRA), Alcalá de Henares, Spain

2 Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain

### References

- [1] Swiegers JH, Pretorius IS. Yeast modulation of wine flavour. *Advances in Applied Microbiology*. 2005;57:131–175. doi:10.1016/S00652164(05)57005-9
- [2] Fleet GH. Which yeast species really conducts the fermentation? In: Williams PJ, Davidson DM, Lee TH, editors. 7th Australian Wine Industry Technical Conference; 13–17 August 1989; Adelaide, Australia; 1990. p. 153–156
- [3] Cray JA, Bell ANW, Bhaganna P, Mswaka AY, Timson DJ, Hallsworth JE. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microbial Biotechnology*. 2013;6:453–492. doi:10.1111/1751-7915.12027
- [4] Barnett JA, Delaney MA, Jones E, Magson AB, Winch B. The numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. *Archives of Microbiology*. 1972;83:52–55
- [5] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 1997;276:734–740. doi:10.1126/science.276.5313.734
- [6] Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture- independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. 1998;180:4765–4774

- [7] Cocolin L, Campolongo S, Alessandria V, Dolci P, Rantsiou K. Culture independent analyses and wine fermentation: an overview of achievements 10 years after first application. *Annals of Microbiology*. 2011;61:17–23. doi:10.1007/s13213-010-0076-6
- [8] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 2004;56:297–314. doi:10.1016 /j.mimet.2003.11.006
- [9] Andorrà I, Landi S, Mas A, Guillamón JM, Esteve-Zarzoso B. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology*. 2010;25:849–856. doi:10.1016/j.fm.2008.05.005
- [10] Blackstone GM, Nordstrom JL, Vickery MC, Bowen MD, Meyer RF, DePaola A. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real-time PCR. *Journal Microbiological Methods*. 2003;53:149–55. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02895.x
- [11] Wang C, Esteve-Zarzoso B, Cocolin L, Mas A, Rantsiou K. Viable and culturable populations of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) during barbera must fermentation. *Food Research International*. 2015;78:195–200. doi:10.1016/j.foodres.2015.10.014
- [12] Gerhards D, Lehnigk C, Buchl N, Wenning M, Scherer S. Biodiversity and development of yeasts from Riesling vines to wines monitored by FT-IR. In: Darriet P, Geny L, Lonvaud A, Lucas P, de Revel G, Teissedre P-L, editors. 9th International Symposium of Oenology-Bordeaux. Dunod: Paris; 2011. p. 263–268
- [13] Hittinger CT, Rokas A, Bai FY, Boekhout T, Gonçalves P, Jeffries TW, Kominek J, Lachance MA, Libkind D, Rosa CA, Sampaio JP, Kurtzman CP. Genomics and the making of yeast biodiversity. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2015;35:100–109. doi:10.1016/j.gde.2015.10.008
- [14] Kurtzman CP, Fell WF, Boekhout T, Robert V. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 2011. p. 87–110
- [15] Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2006;27:15–39
- [16] Van Kerken AE. Contribution to the ecology of yeasts occurring in wine [thesis]. Bloemfontein, South Africa: University of the Orange Free State; 1963
- [17] Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. 2011;5:873–882. doi:10.1016/j.fm.2010.12.001
- [18] Querol A, Jimenez M, Huerta T. Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape harvests in the region of Alicante

- (Spain). Journal of Food Science. 1990;55:1603–1606. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb03580.x
- [19] Jolly NP, Varela C, Pretorius IS. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Research. 2014;14:215–237. doi:10.1111/1567-1364.12111
- [20] Bisson LF, Kunkel R. Microbial interactions during wine production. In: Zeikus JG, Johnson EA editors. Mixed Cultures in Biotechnology. New York: McGraw-Hill; 1991. p. 37–68
- [21] Heard GM, Fleet GH. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. Journal Applied Bacteriology. 1988; 65: 23–28. doi:10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x
- [22] Granchi L, Ganucci D, Messini A, Rosellini D, Vicenzini M. Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello di Montalcino wines. Food Technology Biotechnology. 1998;36:313–318.
- [23] Lachance MA, Kurtzman CP. *Lachancea* Kurtzman (2003). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. The Yeasts: A Taxonomic Study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 2011. p. 511–519
- [24] Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. Yeast. 2003;20:331–341
- [25] Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T, Girio F. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology. 2006;108:336–345. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012
- [26] Wang C, Mas A, Esteve-Zarzoso B. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. International Journal of Food Microbiology. 2015;206:67–74. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.022
- [27] Branco P, Francisco D, Chambon C, Hébraud M, Arneborg N, Almeida MG, Caldeira J, Albergaria H. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014;98:843–853. doi:10.1007/s00253-013-5411-y
- [28] Ciani M, Comitini F, Mannazu I, Domizio P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Research. 2010;10:123–133. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x
- [29] Clemente-Jiménez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermenta-

- tation. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;98:301–308. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007
- [30] Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I and Angulo L. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some compounds of Albarino wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1996;47:206–216
- [31] Sun SY, Gong HS, Jiang XM, Zhao YP. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiology*. 2014;44:15–23. doi:10.1016/j.fm.2014.05.007
- [32] Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;86:181–188. doi:10.1016/S0168-1605(03)00255-1
- [33] Contreras A, Hidalgo C, Henschke PA, Chambers PJ, Curtin C, Varela C. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80:1670–1678. doi:10.1128/AEM.03780-13
- [34] Giovani G, Rosi I, Bertuccioli M. Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;160:113–118. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.007
- [35] Sadoudi M, Tourdot-Marechal R, Rousseaux S, Steyer D, Gallardo-Chacon JJ, Ballester J, Vichi S, Guerin-Schneider R, Caixach J, Alexandre H. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*. 2012;32:243–253. doi:10.1016/j.fm.2012.06.006
- [36] Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;122:312–320. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023
- [37] Izquierdo Cañas PM, Palacios Garcia AT, Garcia Romero E. Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast starter. *Vitis*. 2011;50:177–182
- [38] Gobbi M, Comitini F, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*. 2013;33:271–281. doi:10.1016/j.fm.2012.10.004
- [39] Morata A, Benito S, Loira I, Palomero F, Gonzalez MC, Suarez-Lepe JA. Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;159:47–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.007



- [40] Benito S, Palomero F, Morata A, Calderón F, Palmero D, Suárez-Lepe JA. Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiology*. 2014;42:218–224. doi:10.1016/j.fm.2014.03.014
- [41] Kim DH, Hong YA, Park HD. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters*. 2008;30:1633–1638. doi:10.1007/s10529-008-9726-1
- [42] Ciani M, Ferraro L. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology*. 1998;85:247–254. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00485.x
- [43] Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2003;24:55–62
- [44] Garcia A, Carcel C, Dalau L, Samson A, Aguera E, Agosin E, Gunata Z. Influence of mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles in a Muscat wine. *Journal of Food Science*. 2002;67:1138–1143. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09466.x
- [45] Rodríguez ME, Lopes CA, Valles S, Giraudo MR, Caballero A. Selection and preliminary characterization of  $\beta$ -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;41:812–820. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.07.004
- [46] Rodríguez ME, Lopes CA, Barbagelata R, Barda NB, Caballero AC. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;138:19–25. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025
- [47] Moreira N, de Pinho PG, Santos C, Vasconcelos I. Volatile sulphur compounds composition of monovarietal white wines. *Food Chemistry*. 2010;123:1198–1203. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.086
- [48] Medina K, Boido E, Fariña L, Gioia O, Gomez ME, Barquet M, Gaggero C, Dellacassa E, Carrau F. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*. 2013;141:2513–2521. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.056
- [49] Domizio P, Romani C, Lencioni L, Comitini F, Gobbi M, Mannazzu I & Ciani M. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2011;147:170–180. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020
- [50] Domizio P, Romani C, Comitini F, Gobbi M, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M. Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*. 2011;61:137–144. doi:10.1007/s13213-010-0125-1

- [51] Kurita O. Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;104:1051–1058. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03625.x
- [52] Anfang N, Brajkovich M, Goddard MR. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2009;15:1–8. doi:10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x
- [53] Benito S, Morata A, Palomero F, Gonzalez MC, Suarez-Lepe JA. Formation of vinyl-phenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*. 2011;124:15–23. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.096
- [54] Rogerson FSS, Vale E, Grande HJ, Silva MCM. Alternative processing of port-wine using pectolytic enzymes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2000;2:222–227
- [55] Esteve-Zarzoso B, Manzanares P, Ramón D, Querol A. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology*. 1998;1:143–148
- [56] Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG, Van Rensburg P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91:182–190. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x
- [57] McKay AM. Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*. 1990;11:41–44. doi:10.1111/j.1472-765X.1990.tb00132.x
- [58] Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA, Todd BEN. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeast for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape Wine Research*. 1997;3:2–8. doi:10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x
- [59] Lambrechts MG, Pretorius IS. Yeast and its importance to wine aroma. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2000;21:97–129
- [60] Ubeda-Iranzo JF, Briones-Perez AI, Izquierdo-Canas PM. Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiology*. 1998;15:399–406. doi:10.1006/fmic.1998.0183
- [61] Cordero-Bueso G, Esteve-Zarzoso B, Cabellos JM, Gil-Díaz M, Arroyo T. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology*. 2012;236:193–207. doi:10.1007/s00217-012-1874-9
- [62] Pocock KF, Waters EJ. Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Australian Journal of Grape Wine Research*. 2006;12:212–220. doi:10.1007/s00217-012-1874-9

- [63] Charpentier C, Nguyen Van Long T, Bonaly R, Feuillat M. Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1986;24:405–413
- [64] Perez-Serradilla JA, Luque de Castro, MD. Role of lees in wine production: a review. *Food Chemistry*. 2008;111:447–456. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.019
- [65] Vidal S, Francis L, Williams P, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier W, Waters E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*. 2004;85:519–525. doi:10.1016/S0308-8146(03)00084-0
- [66] Gonzalez-Royo E, Pascual O, Kontoudakis N, Esteruelas M, Esteve-Zarzoso B, Mas A, Canals JM, Zamora F. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food and Research Technology*. 2015;240:999–1012. doi:10.1007/s00217-014-2404-8
- [67] Canal-Llaubères RM. Enzymes in winemaking. In: Fleet GH editors. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Philadelphia: Hardwood Academic Publishers. 1993. p. 477–506
- [68] Romero-Cascales I, Ros-García JM, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry*. 2012;130:626–631. doi:10.1016/j.foodchem. 2011.07.091
- [69] Dubourdieu D, Darriet P, Ollivier C, Boidron JN, Ribèreau-Gayon P. Role of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in enzymatic hydrolysis of terpenic heterosides of grape juice. *Compts Rendus de l'Academie des Sciences Paris*. 1988;306:489–493
- [70] Spaepen M, Verachtert H. Esterase activity in the genus *Brettanomyces*. *Journal of the Institute of Brewing*. 1982;88:11–17
- [71] Lee H, To RJB, Latta RK, Biely P, Schneider H. Some properties of extracellular acetyl-xylan esterase produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987;53:2831–2834
- [72] Besançon X, Ratomahenina R, Galzy P. Isolation and partial characterization of an esterase (EC 3.1.1.1) from a *Debaryomyces hansenii* strain. *Netherland Milk and Dairy Journal*. 1995;49:97–110
- [73] Valentin G, Crouzet J. Peroxide cleavage enzyme in grapes. In: Ribèreau-Gayon P, Lonvaud A, editors. *Actualités Oenologiques 89*. Paris: Bordas, 1989. p. 133–138
- [74] Ratledge C, Tan KH. Oils and fats: production. Degradation and utilization by yeasts. In: Verachtert H, De Mot R editors. *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*. New York: Marcel Dekker. 1990. p. 223–254
- [75] Pérez G, Fariña L, Barquet M, Boido E, Gaggero C, Dellacassa E, Carrau F. A quick screening method to identify  $\beta$ -glucosidase activity in native wine yeast strains:



- application of esculin glycerol agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27:47–55. doi:10.1007/s11274-010-0425-4
- [76] Ganga MA, Martínez C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96:76–83
- [77] Mira de Orduña, R. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*. 2010;43:1844–1855. doi:10.1016/j.foodres.2010.05.001
- [78] Schmidtke LM, Blackman JW, Agboola SO. Production technologies for reduced alcoholic wines. *Journal of Food Science*. 2012;71:25–41. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02448.x
- [79] Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F. Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2011;17:230–238. doi:10.1111/j.1755-0238.2011.00142.x
- [80] Kutyna DR, Varela C, Henschke PA, Chambers PA, Stanley GA. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends Food Science & Technology*, 2010;21:293–302. doi:10.1016/j.tifs.2010.03.004
- [81] Abalos D, Vejarano R, Morata A, Gonzalez C, Suarez-Lepe JA. The use of furfural as a metabolic inhibitor for reducing the alcohol content of model wines. *European Food Research and Technology*. 2011;232:663–669. doi:10.1007/s00217-011-1433-9
- [82] Teissedre PL. Alcohol reduction in wine. Villenave d'Ornon: Vigne et Vin Publications Internationales. 2013. vol. 1. 108 p.
- [83] Ehsani M, Fernandez MR, Biosca JA, Julien A, Dequin S. Engineering of 2,3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol- overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*. 2009;75:3196–3205. doi:10.1128/AEM.02157-08
- [84] Cadière A, Ortiz-Julien A, Camarasa C, Dequin S. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metabolic Engineering*. 2011;13:263–271. doi:10.1016/j.ymben.2011.01.008
- [85] Gonzalez R, Quiros M, Morales P. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends in Food Science and Technology*. 2013;29:55–61. doi:10.1016/j.tifs.2012.06.015
- [86] Piškur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, Compagno C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*. 2006;22:183–186. doi:10.1016/j.tig.2006.02.002

- [87] de Deken RH. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*. 1966;44:149–156.
- [88] Venturin C, Boze H, Moulin G, Galzy P. Influence of oxygen limitation on glucose metabolism in *Hanseniaspora uvarum* K5 grown in chemostat. *Biotechnology Letters*. 1995;17:537–542.
- [89] Contreras A, Hidalgo C, Schmidt S, Henschke PA, Curtin C, Varela C. The application of non-*Saccharomyces* in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;205:7–15. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027
- [90] Eustace R, Thornton R. Selective hybridization of wine yeasts for higher yields of glycerol. *Canadian Journal of Microbiology*. 1987;33:112–117
- [91] Quiros M, Rojas V, Gonzalez R, Morales P. Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*. 2014;181:85–91. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024
- [92] Bartowsky EJ, Henschke PA. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;125:60–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016
- [93] Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;86:23–50. doi:10.1016/S0168-1605(03) 00246-0
- [94] Stead D. The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine- spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 1993;75:135–141. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02758.x
- [95] Gómez-Rivas L, Escudero-Abarca B, Aguilar-Uscanga MG, Hayward-Jones P, Mendoza P, Ramírez M. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004;31:16–22. doi:10.1007/s10295-004-0112-2
- [96] Rojo-Bezares B. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;116:32–36. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.020
- [97] Gerbaux V, Villa A, Monamy C, Bertrand A. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1997;48:49–54
- [98] Enrique M, Ibanez A, Marcos JF, Yuste M, Martinez M, Valles S, et al. b-Glucanases as a tool for the control of wine spoilage yeasts. *Journal of Food Science*. 2010;71:41–45. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01448.x
- [99] Mehlomakulu NN, Setati ME, Divol B. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp.

- International Journal of Food Microbiology. 2014;188:83–91. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015
- [100] Thomas LV, Ingram RE, Bevis HE, Brightwell P, Wilson N, Delves-Broughton J. (2005). Natamycin control of yeast spoilage of wine. Food Protection Trends. 2005;25:510–517
- [101] Enrique M, Marcos JF, Yuste M, Martínez M, Valles S, Manzanares P. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. International Journal of Food Microbiology. 2007;118:318–325. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.049
- [102] Enrique M, Marcos JF, Yuste M, Martinez M, Valles S, Manzanares P. Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. International Journal of Food Microbiology. 2008;127:229–234. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.011
- [103] Chavan PS, Tupe SG. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. Food Control. 2014;46:115–120. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.007
- [104] Miranda JM, Jorge F, Dominguez L, Cepeda A, Franco CM. In vitro growth inhibition of food-borne pathogens and food spoilage microorganism by vitamin K5. Food Bioprocess Technology. 2011;4:1060–1065. doi:10.1007/s11947-010-0413-6
- [105] Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. Yeast killer systems. Clinical Microbiology Reviews. 1997;10:369–400
- [106] Gutiérrez AR, Epifanio S, Garijo P, López R, Santamaría P. Killer yeasts: incidence in the ecology of spontaneous fermentation. American Journal of Enology and Viticulture. 2001;52:352–356
- [107] Santos A, Navascués E, Bravo E, Marquina D. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. International Journal of Food Microbiology. 2011;145:147–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.005
- [108] Comitini F, Ciani M. The zymocidial activity of *Tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking. Letters Applied of Microbiology. 2010;50:50–56. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02754.x
- [109] Santos A, Marquina D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. Microbiology. 2004;150:2527–2534. doi:10.1099/mic.0.27071-0
- [110] Fleet GH. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Research. 2008;8:979–995. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x
- [111] Pretorius IS, Curtin CD, Chambers PJ. The winemaker's bug: from ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science. Bioengineered Bugs. 2012;3:147–156. doi:10.4161/bbug.19687

INTECH

INTECH

### **3.2. The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates**

García, M., Greetham, D., Wimalasena, T. T., Phister, T. G., Cabellos, J. M. y Arroyo, T.

Publicado en:

Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(1),  
pp. 215–233. doi: 10.1111/jam.13139

#### **La caracterización fenotípica de cepas de levaduras a estreses inherentes a la fermentación del vino en climas cálidos**

##### **RESUMEN**

**Objetivos:** El cambio climático está ejerciendo un profundo efecto en la composición de la uva, microbiología, química y en aspectos sensoriales del vino. La identificación de levaduras autóctonas tolerantes a estrés podría ayudar a aliviar este efecto.

**Métodos y Resultados:** Se ha estudiado la tolerancia a presión osmótica, etanol y pH de 94 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y 29 cepas de no-*Saccharomyces* pertenecientes a la D.O. “Vinos de Madrid” (España), una región de clima cálido, usando la tecnología de fenotipo microarray en base a su comportamiento fermentativo. El análisis destacó 12 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de bodegas ecológicas con mejor tolerancia a estrés osmótico, altas concentraciones de etanol y adecuadas propiedades fermentativas. Las especies de no-*Saccharomyces* como *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Metschnikowia pulcherrima* también destacaron por su tolerancia a estas condiciones de estrés.

**Conclusiones:** Este estudio confirma la adaptación de las cepas nativas a las condiciones climáticas de cada área de producción y estas adaptaciones se correlacionan con sus buenas propiedades fermentativas. El análisis ha revelado que la identificación de cepas de levaduras adaptadas a situaciones de estrés fermentativo es una buena estrategia para elaborar vinos de calidad en áreas de clima cálido.

**Sentido e Impacto del estudio:** Los resultados tienen una relevancia especial porque es un estudio pionero que ha abordado el problema del cambio climático en vinos desde un aspecto microbiológico y se ha analizado la situación *in situ* en bodegas de una zona de producción de clima cálido. Las cepas resistentes mostraron buenas propiedades biológicas; el estudio de los mecanismos de respuesta a estrés durante la fermentación en estas cepas sería de gran interés para la industria del vino.

**Contribución personal al manuscrito:** Yo he colaborado en la preparación de las muestras para su posterior análisis y en la redacción del manuscrito.

## ORIGINAL ARTICLE

**The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates**M. García<sup>1</sup>, D. Greetham<sup>2</sup>, T.T. Wimalasena<sup>2</sup>, T.G. Phister<sup>3</sup>, J.M. Cabellos<sup>1</sup> and T. Arroyo<sup>1</sup><sup>1</sup> Departamento de Calidad Agroalimentaria, IMIDRA, Alcalá de Henares, Spain<sup>2</sup> Bioenergy & Brewing Science, School of Biosciences, University of Nottingham, Loughborough, UK<sup>3</sup> Pepsico Int, Leicester, UK**Keywords**

climate change, fermentation, phenotypic characterization, stress, yeast.

**Correspondence**Teresa Arroyo, Departamento de Calidad Agroalimentaria, IMIDRA, Ctra. A2, Km. 38.200, Alcalá de Henares 28800, Spain.  
E-mail: teresa.arroyo@madrid.org

2016/0287: received 1 July 2015, revised 5 February 2016 and accepted 11 March 2016

doi:10.1111/jam.13139

**Abstract****Aims:** Climate change is exerting an increasingly profound effect on grape composition, microbiology, chemistry and the sensory aspects of wine. Identification of autochthonous yeasts tolerant to stress could help to alleviate this effect.**Methods and Results:** Tolerance to osmotic pressure, ethanol and pH of 94 *Saccharomyces cerevisiae* strains and 29 strains non-*Saccharomyces* from the warm climate region DO 'Vinos de Madrid' (Spain) using phenotypic microarray and their fermentative behaviour were studied. The screening highlighted 12 strains of *S. cerevisiae* isolated from organic cellars with improved tolerance to osmotic stress, high ethanol concentrations and suitable fermentative properties. Screening of non-*Saccharomyces* spp. such as *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Metschnikowia pulcherrima* also highlighted tolerance to these stress conditions.**Conclusions:** This study confirmed the adaptation of native strains to the climatic conditions in each area of production and correlated these adaptations with good fermentation properties. Screening has revealed that identifying yeast strains adapted to fermentation stresses is an important approach for making quality wines in very warm areas.**Significance and Impact of the Study:** The results have special relevance because it is a pioneering study that has approached the problem of climate change for wines from a microbiological aspect and has analysed the situation *in situ* in wineries from a warm climate zone. Resistant strains were found with good biological properties; studying these strains for their stress response mechanisms during fermentation will be of interest to the wine making industry.**Introduction**

At the beginning of vinification, yeast cells are affected by osmotic stress due to the high concentration of sugar in musts, and a relatively low pH (<4). As the fermentation progresses yeast cells are exposed to other stresses such as ethanol accumulation and nutrient limitation, especially nitrogen, carbon and vitamins depletion (Attfield 1987; Bauer and Pretorius 2000; Nikolau *et al.* 2006; Gibson *et al.* 2007; Salvadó *et al.* 2008). To avoid a loss of

viability, the yeasts have developed a response to environmentally adverse conditions – the so-called environmental-stress response (ESR) (Bauer and Pretorius 2000; Gasch *et al.* 2000; Pérez-Ortín *et al.* 2002; Zuzuarregui and del Olmo 2004; Zuzuarregui *et al.* 2006; Dequin and Casaregola 2011).

Observations from various worldwide winemaking regions over the past 30 years have provided evidence of modified vine development and fruit maturation patterns (Stock *et al.* 2005). Climate change is exerting an



increasingly profound effect on vine phenology and grape composition; these changes ultimately affect vinifications, wine microbiology, chemistry and the sensory aspects of wine (Bernetti *et al.* 2012; Palliotti *et al.* 2014). The consequence to grape chemistry is substantial: elevated fruit sugar, a lower concentration of acids (especially malic acid) and lower levels of anthocyanins and methoxypyrazine. A higher sugar level delivers shifts in alcohol, altering flavours and mouthfeel. Musts with high sugar concentrations cause a stress response in yeast leading to an increased formation of fermentation co-products, such as acetic acid. A lower concentration of malic acid, especially in white wines, may force the addition of tartaric acid to enhance mouthfeel and microbial stability (Mira de Orduña 2010). Inadequate phenolic ripening of the grapes due to climate change can make wines more astringent, making this a limiting factor for microbial activity. Lower concentrations of anthocyanins in red wine will reduce the colour potential (Keller 2010) and this effect may be accentuated in the future due to the adverse effects of climate change (Loira *et al.* 2011).

Any shift in climate and weather patterns may potentially affect the wine industry. Winegrapes and wine, as an economic commodity, are both at risk due to climate change (Renée and Mozell 2014). Mediterranean regions are at the hotter and drier climatic margins for the productive growth of *Vitis vinifera* (Lereboullet *et al.* 2012). Spain, one of the traditional wine producing countries, could become one of the first wine-growing areas in the world where grape growing becomes unviable (Castro *et al.* 2005; Moreno Rodríguez 2005; Duarte and O'Neill 2011). This is all the more relevant, given the high level of economic dependency on grape growing (Duarte and O'Neill 2011; Palliotti *et al.* 2014). The Denomination of Origin (D.O.) 'Vinos de Madrid' is located in the centre of Spain (between 40°16'00"N and 40°24'59"N latitude), and its demarcation is still relatively new; it was created in 1990, and covers an area of 11·758 ha. This region is characterized by temperatures ranging from –8°C minimum in winter to 41°C maximum in summer (Cordero-Bueso *et al.* 2013); rainfall ranges between 461 and 658 mm, mainly falling in spring and autumn. Part of the economic development of this area is based on wine production with winemakers searching for new techniques to increase the number of wines on offer. The selection of autochthonous yeast is a very important goal for the diversity and typicity of these wines (Tello *et al.* 2012), especially considering the potential impact that global warming will have on the wine industry (Battagliani *et al.* 2009; Lereboullet *et al.* 2012). Solutions to these problems will be partially brought about by changes in vineyard management, however, a strategy identifying osmotic and ethanol tolerant yeast will also alleviate the

problem (Vink *et al.* 2009; Mira de Orduña 2010; E-Viticulture 2012).

In order to achieve the above objectives we assessed microbial suitability under stress conditions using a phenotype microarray assay (Greetham *et al.* 2014; Wimalasena *et al.* 2014) for a better understanding of the behaviour of autochthonous yeast during fermentation stress conditions in a warm climate. Further some selected strains were assessed for performance in fermentations using natural must.

## Material and methods

### Yeast strains

A total of 1557 yeast strains were isolated from six vineyards and cellars located in the areas of Arganda, Navalcarnero and San Martín de Valdeiglesias, all within the warm climate region 'Vinos de Madrid'. The description of how the strains were isolated is described in Tello *et al.* (2012). In terms of wine production, four of the wineries (A, D, E and F) utilize an organic system of wine production and the other two cellars (B and C) use a conventional production system. In cellars A, E and F the fermentation was spontaneous. Cellar B used the commercial strain IOC Primrouge-R9001 (G 113). In cellar C Enartis Ferm ES 454 and in cellar D the commercial strain Uvaferm L2056-Danstar (G10) was inoculated (Table 1).

Included in the study were 29 non-*Saccharomyces* strains whose selection was based on their biotechnological potential (Arroyo *et al.* 2010; Cordero-Bueso *et al.* 2013). *Candida stellata* (three strains), *Candida vini*, *Debaryomyces carsonii*, *Hansenula* sp., *Kloeckera apiculata* (two strains), *Lachancea thermotolerans* (two strains), *Metschnikowia pulcherrima* (six strains), *Meyerozyma guilliermondii* (three strains), *Pichia membranaefaciens*, *Pichia toletana*, *Rhodotorula* sp., *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* (four strains) and *Zygosaccharomyces fermentati*, 18 from the yeast collection of IMIDRA and 11 isolates of spontaneous fermentations from the autochthonous variety Malvar (Cordero-Bueso *et al.* 2013).

The autochthonous strain, CLI 889 from the IMIDRA collection, selected by our group for white wine elaboration was used as a quality control of the selected resistant yeast fermentative characteristics. This strain has been deposited in Spanish Type Culture Collection (CECT 13145).

### Molecular identification of yeasts isolates

All strains were characterized to species level by PCR-RFLP, amplifying the intergene region of ITS1 and ITS4



**Table 1** Cellar, origin zone, farming system, fermentation type, fermentative phase and number of autochthonous genotypes of *Saccharomyces* isolated

Cellar	Zone	Farming system	Fermentation type	Number of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolates	Number of genotypes of <i>S. cerevisiae</i>	I	II	III	IV
A	SM	Organic	Spontaneous	159	18	1			17
B	N	Conventional	IOC Primrouge	43	1				1
C	A	Conventional	Enartis Ferm ES454	81	1				1
D	A	Organic	Uvaferm L2056	99	5	1			4
E	SM	Organic	Spontaneous	166	45	5	1	11	28
F	A	Organic	Spontaneous	165	24	2	4	9	9

SM, San Martín de Valdeiglesias; N, Navalcarnero; A, Arganda. Fermentative phase I ( $\approx$ density 1090), phase II ( $\approx$ density 1060), phase III ( $\approx$ density 1030), phase IV ( $\approx$ density 990).

of the 5-8 rDNA gene as described previously by Cordero-Bueso *et al.* (2011a). The DNA patterns were compared with those described previously (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999; Fernández-Espinar *et al.* 2000). Furthermore, certified yeast strains provided by CECT (Spanish Type Culture Collection) were used to corroborate the results obtained.

#### Identification of *Saccharomyces cerevisiae* to strain level

Microsatellite multiplex PCR analysis was used to identify the different strains of *S. cerevisiae* using the highly polymorphic loci SC8132X, YOR267C and SCPTS7 (Vaudano and García-Moruno 2008). The size of the fragments obtained was determined by automatic electrophoresis with a Genetic Analyzer ABI3130 (Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid, Spain) with results reported previously (Tello *et al.* 2012).

#### Phenotypic microarray analysis

Phenotypic microarray (PM) is commercially available through Biolog, Inc. (Hayward, CA). This system works by measuring the metabolic output colorimetrically using a microplate reader or the Omnilog unit (Biolog). By comparing metabolic output, phenotypic variation between yeast strains can be observed (DeNittis *et al.* 2010; Borglin *et al.* 2012). The intrinsic properties of the autochthonous strains such as ethanol, osmotic or acidic pH tolerance were analysed in order to select the strains most adapted to the warm climate conditions in the Madrid region.

PM (Biolog) growth medium was prepared using 6 g l<sup>-1</sup> (w/v) glucose, 0.67 g l<sup>-1</sup> (w/v) yeast nitrogen base (YNB), 0.2 µl of dye D (Biolog) and supplemented with a nutrient mixture (NS) (NS  $\times$  48, 24 mmol l<sup>-1</sup> adenine-HCl, 4.8 mmol l<sup>-1</sup> L-histidine-HCl monohydrate, 48 mmol l<sup>-1</sup> L-leucine, 24 mmol l<sup>-1</sup> L-lysine-HCl, 12 mmol l<sup>-1</sup> L-methionine, 12 mmol l<sup>-1</sup> L-tryptophan

and 14.4 mmol l<sup>-1</sup> uracil). Biolog redox dye contains a tetrazolium-based reagent that can be reduced to a soluble purple formazan product by live cells in a culture medium. The amount of formazan is measured spectrophotometrically at 590 nm and is directly proportional to the number of living respiring cells (Berridge *et al.* 2005). The final volume of the growth medium was made up to 30 µl using sterile distilled water, inhibitory compounds were added as appropriate and water removed to maintain a 30 µl volume.

For assays looking at the effect of osmotic pressure on the metabolic output of the yeasts a stock solution of 80% sorbitol (w/v), a non-fermentable carbon source, was prepared and adjusted to generate 20 and 30% (w/v) concentrations in a final volume of 120 µl. As sorbitol does not dissociate into ions in liquids and cannot be assimilated by yeasts, it can be used as a stress agent to observe the effect of osmotic stress on yeast cells (Hirasawa *et al.* 2006). Assays with ethanol used 8% (v/v) and 13% (v/v) to induce ethanol stress. Assays looking into pH used media YNB modified to the starting pH using phosphoric acid, and then filter sterilized (Greetham *et al.* 2014).

The strains were prepared for inoculation into the PM assay plates as follows. Glycerol stocks stored at -80°C were streaked on to yeast extract peptone dextrose (YPD) plates and incubated at 30°C for approx. 48 h. Two to three colonies from each strain were re-streaked to one section of a fresh YPD plate and incubated overnight at 30°C. The cells were then inoculated into sterile water in 20  $\times$  100 mm test tubes and adjusted to a transmittance of 62% (approx. 5  $\times$  10<sup>6</sup> cells per ml).

The cell suspension for inoculation was prepared by mixing 125 µl of cells with 2.65 ml of IFY buffer (Biolog) and adjusted to a final volume of 3 ml by the addition of sterile deionized water. Then 90 µl of the above mix was inoculated to each well in a Biolog 96-well plate. Anaerobic conditions were created using oxygen absorbing packs (Mitsubishi AnaeroPak™ System) with an anaerobic indicator (Oxoid, UK) and the plates were placed inside PM gas

bags (Biolog). The plates were then placed in the OmniLog reader and incubated for 96 h at 30°C without shaking.

The OmniLog reader photographs the plates at 15 min intervals, converting the pixel density in each well to a signal value reflecting cell growth and dye conversion. After completion of the run, the signal data were compiled and exported from the BIOLOG software into Microsoft® Excel for further analysis. In all cases, a minimum of three replicate PM assay runs were conducted, and the average of the signal values was plotted.

The percentage redox signal intensity was calculated using the redox signal intensity values at 25 h in each stress condition compared with the non-stressed condition at the same time point.

#### Fermentation rate

A measure of CO<sub>2</sub> (g) evolution was used to evaluate the fermentation rate, in order to determine how fast the cells consumed sugars (Powell *et al.* 2008). The fermenters were filled with clarified must from white variety Malvar grapes (*V. vinifera* L.), 100 ml to must I (21.5° Brix; pH: 3.4; total acidity: 6.36 g l<sup>-1</sup> and YAN 160 mg l<sup>-1</sup>) and 5 l to must II, more rich in sugar concentration and a lower pH than must I (23.0° Brix, pH 3.2 adjusted with tartaric acid; total acidity: 7.03 g l<sup>-1</sup> and YAN 160 mg l<sup>-1</sup>). The must was pasteurized to fluent vapour in an autoclave at 80°C, 15 min, three times on three consecutive days, to avoid caramelization of the sugars. Then the fermenters were inoculated with 10<sup>6</sup> CFU per ml of yeast inoculum and finally placed in a temperature controlled chamber at 20°C with mechanical agitation (150 rev min<sup>-1</sup>). The fermentation progress was monitored daily by weight loss determination (Cordero-Bueso *et al.* 2011a). When the CO<sub>2</sub> evolution stopped (constant weight), the samples were analysed. All the fermentations were done in triplicate.

#### Determination of killer activity

The test for killer activity was performed in low pH (pH 4.0 and 4.7) 4-methylene blue plates (4 and 4.7 MB) seeded with 100 ml of a 48 h YPD culture of the sensitive *S. cerevisiae* CECT 16865 and resistant killer factor strain CECT 16864 and were incubated for 4 day at 20°C. Killer strains produce a clear halo as a result of killing the seeded sensitive yeasts (Ramírez *et al.* 2004).

#### Analytical determinations

The intrinsic properties potentially related to the fermentative capacity and the yeasts' response to stressful conditions were analysed: ethanol, glycerol, pH, glucose,

fructose, malic acid, tartaric acid, citric acid and succinic acid of wine and must under fermentation were evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy by employing the WineScan Flex (FOSS Analytical, Denmark).

#### Volatile compound analysis

Quantification of the major volatile compounds of wines was carried out by GC-FID. The analysed compounds were: ethyl propanoate, ethyl butyrate, ethyl isobutyrate, ethyl isovalerate, isobutanol, isoamyl acetate, 1-butanol, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, hexyl acetate, acetoin, 1-propanol, ethyl lactate, 1-hexanol, (Z)-3-hexenol, ethyl octanoate, ethyl 3-hydroxybutyrate, isobutyric alcohol,  $\gamma$ -butyrolactone, benzaldehyde, butyric acid, isovalerianic acid, diethyl succinate, methionol, 2-phenylethyl acetate, hexanoic acid, benzylic alcohol,  $\beta$ -phenylethanol, furfural, octanoic acid and decanoic acid (Gil *et al.* 2006; Balboa-Lagunero *et al.* 2013).

#### Sensory analysis

Sensory analyses of wines were performed by a trained panel of seven expert judges (four women and three men) from the IMIDRA Institute. This panel had been trained previously in the laboratory in the recognition of wine aromas. The general card included the terms overall intensity, overall quality and off-flavours, and the descriptors: fruity, herbal, phenolic, microbiologic, chemical, sweet, acid and alcoholic. All terms from the card were evaluated on a scale from 1 (low intensity) to 10 (high intensity). The final score was obtained as the mean of the seven evaluations with their respective standard deviation (Arroyo *et al.* 2009; Balboa-Lagunero *et al.* 2013).

#### Statistical treatment of the data

Analysis of variance (ANOVA) was applied to the experimental data for the main enological characteristics of the mixed fermentations. Tukey HSD post-hoc tests were applied to establish the significance of differences between means ( $\alpha = 0.05$ ). The contribution of the studied variables to the differences between strains was estimated by principal component analysis (PCA) using SPSS statistics 19 (SPSS Inc., Chicago, IL).

### Results

#### Characterization of yeast strains

Using the PCR-RFLP analysis of the ribosomal ITS region of the 1557 yeast strains isolated from three areas of Origin Denomination 'Vinos de Madrid', we observed that

713 isolates corresponded to *S. cerevisiae*. After applying the simple sequence repeats technique (Vaudano and García-Moruno 2008), these yeasts were grouped into 94 different genotypes. In Table 1, the origin, cellars, farming system and fermentative phase of isolation of these genotypes are shown. A low number of genotypes were observed throughout the induced fermentation. Note that in cellar B, the 43 strains isolated corresponded with the commercial yeasts used, IOC Primrouge, denominated G113. In winery C, the 81 *Saccharomyces* isolated corresponded with genotype G114, that is they did not correspond with the commercial yeast used, Enartis Ferm ES 454. In cellar D, where the commercial yeast L2056 (G10) was used, 99 strains were isolated over five genotypes: G10, G11, G379, G406 and G448. The G10 genotype corresponded to the commercial yeast Uvaferm L2056 and was not the genotype that controlled the fermentation.

In ecological wineries using spontaneous fermentation (A, E, F) there were numerous *Saccharomyces* strains. We observed a sequence of strains along the fermentation process. Over 60% of the genotypes found corresponded to the last phase of fermentation (IV), although there were also representative strains from the other three phases of sampling, 11% to phase I, 5% to phase II and 20% to phase III.

#### Phenotypic variation of the yeast strains to fermentation stresses

The 94 autochthonous genotypes of *S. cerevisiae* and 29 non-*Saccharomyces* strains were exposed to stress conditions that are important during alcoholic fermentation: osmotic (20% (w/v) and 30% (w/v) sorbitol), ethanol (5% (v/v), 8% (v/v), 13% (v/v) and 18% (v/v)) and pH (3.0 and 3.4) stress and the effect on redox signal intensity was measured using PM technology (Table 2).

#### Tolerance of wine yeast to osmotic stress

Osmotic stress (induced by the presence of a non-fermentable carbon source sorbitol), ethanol or pH had a profound effect on the redox signal intensity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains when compared with non-stress conditions, and we were able to identify sensitive and tolerant strains for each stress condition. In our experiments, we observed that most of the *Saccharomyces* genotypes exhibited sensitivity to the presence of 20 and 30% sorbitol; however, strains G490 (cellar E), G519, G520, G521 and G522 all from cellar F, were tolerant to 30% sorbitol (Fig. 1a). The G113 commercial yeasts used in cellar B showed a good resistance to osmotic pressure, 90.55% of metabolic output at 20% sorbitol and 75.59% at 30% sorbitol. For the commercial strain G10 from cellar D,

resistance was lower with values of 78.32% at 20% sorbitol and 55.94% at 30% sorbitol, respectively.

In general, the non-*Saccharomyces* strains were more sensitive to the presence of sorbitol when compared with the sensitivities observed in the *Saccharomyces* genotypes. Strains *K. thermotolerans*, *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* exhibited an intermediate sensitivity to the presence of sorbitol with metabolic output reduced to 40 and 60%, respectively, when compared with unstressed conditions (Fig. 1a). The *S. cerevisiae* genotypes 490, 519, 520, 521 and 522, displayed a >100% metabolic output at 20% sorbitol and genotypes 490, 520, 521 and 505 (cellar F) at 30% sorbitol, indicating that the presence of sorbitol was not inhibiting the metabolic output of these strains (Table 2). The most resistant genotypes came from two organic areas of DO 'Vinos de Madrid' and were predominantly isolated from winery F. All the *S. cerevisiae* studied were isolated from phase IV, except strain 490, which was isolated in phase III from cellar E and genotype 505 present in phase II from cellar F. When a comparison of means was performed, significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed in resistance to osmotic pressure between different cellars. The best strains of yeasts with the capacity to tolerate values of 30% sorbitol were isolated from cellar F making Tempranillo wine from the Arganda zone.

#### Tolerance of wine yeast to ethanol

The tolerance of yeast to ethanol was assayed at concentrations between 5 and 18% ethanol to identify tolerant and sensitive strains (Fig. 1b). The presence of 5 and 8% ethanol was well tolerated by all strains in this study (with an output value from 30.32% with G462 to 150.63% with genotype 521), however, only 18% of the strains displayed a metabolic output over 30% in the presence of 13% ethanol and only two strains, G491 (24.79%) and G516 (23.74%), displayed any metabolic output in the presence of 18% ethanol. Genotype 113 showed values of 70.87% at 5% ethanol, 74.77% at 8% ethanol and -4.72% at 13% ethanol. Commercial strain G10 presented values of 79.37, 20.98 and 0.70%, respectively.

Some non-*Saccharomyces* strains such as *Kluyveromyces thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *Hansenula anomala*, *Meyerozyma guilliermondii* and *T. delbrueckii* were weakly tolerant with a metabolic output rate around 20% in assays with 18% ethanol. When assessing for tolerance to ethanol, it was observed that *S. pombe* displayed the highest metabolic output (30.2%) in the presence of 13% ethanol. Genotypes G19 (cellar A), G114 (cellar C) and G462 (cellar E) were the most sensitive to ethanol, displaying no metabolic output in the presence of 8% ethanol. A means comparison study determined that resistance to alcohol was

**Table 2** Genotype, cellar, fermentative behaviour and phenotype killer and results of stress fermentative biologic ratio (%) of the 94 autochthonous strains of *Saccharomyces cerevisiae*

G	C	FP	FD	%E	VA	K	5%E	8%E	12%E	18%E	20%S	30%S	pH 3-0	pH 3-4
1	A	IV	16	11.7	0.50	N	124.53	76.72	2.59	−2.16	64.84	20.58	96.74	−
2	A	IV	16	11.2	0.77	N	92.58	96.99	1.56	−	85.56	47.66	115.04	−
3	A	IV	18	5.3	0.57	N	79.66	13.45	2.07	−	66.55	48.62	112.76	−
4	A	IV	17	11.2	0.53	K	88.68	8.68	1.51	−	84.53	60.00	69.81	−
6	A	IV	16	12.4	0.50	N	−	103.17	27.60	4.07	78.73	77.83	81.00	113.12
7	A	IV	14	10.9	0.31	K	−	103.70	15.74	5.09	81.02	79.63	85.65	109.72
8	A	IV	17	8.9	0.43	N	−	97.22	3.17	4.37	82.94	77.78	80.56	86.51
9	A	I	16	12.1	0.89	N	18.97	1.72	2.59	−	51.29	8.62	55.17	−
10	D	IV	14	11.5	0.49	N	79.37	20.98	0.70	−	78.32	55.94	74.48	−
11	D	IV	15	11.0	0.40	N	86.11	21.18	3.13	−	82.29	48.26	79.51	−
12	A	IV	16	3.9	0.49	N	71.38	11.84	1.97	−	84.21	48.03	99.34	−
13	A	IV	16	11.6	0.51	N	101.71	44.55	31.93	−	64.52	52.83	61.10	−
14	F	IV	14	10.9	0.50	N	−	102.48	8.68	7.44	81.82	65.29	87.19	106.61
15	A	IV	15	10.9	0.35	N	−	83.54	9.28	0.42	68.35	74.26	76.37	99.16
16	A	IV	15	11.3	0.60	N	−	95.76	8.47	6.36	86.44	72.88	80.93	98.31
17	A	IV	17	9.2	0.20	N	74.14	25.52	−5.52	−	57.24	42.07	86.21	−
18	A	IV	15	10.3	0.91	N	81.30	5.73	−2.29	−	67.56	50.38	78.63	−
19	A	IV	16	13.2	0.55	N	79.12	30.92	−4.42	−	75.50	47.39	79.92	−
20	A	IV	17	11.9	0.54	N	83.76	37.18	−4.70	−	87.61	67.09	105.98	−
22	A	IV	18	10.9	0.43	N	89.17	26.67	−5.83	−	80.42	67.08	89.58	−
113	B	IV	17	12.2	0.25	N	70.87	74.77	−4.72	−	90.55	75.59	108.26	−
114	C	IV	18	11.9	0.22	N	82.11	39.30	−2.81	−	82.11	55.79	70.18	−
144	A	IV	15	12.2	0.41	N	107.24	32.35	38.40	−	70.16	73.12	84.34	−
147	E	IV	17	11.1	0.39	N	79.62	8.68	1.89	−	61.13	44.15	102.26	−
198	E	IV	17	11.7	0.64	N	91.86	17.44	5.43	−	51.55	41.86	114.73	122.71
227	E	IV	18	12.1	0.62	N	85.90	21.37	3.42	−	67.95	55.98	92.31	−
354	E	IV	15	10.9	0.43	N	80.68	19.32	1.89	−	64.02	48.11	72.35	−
361	E	IV	18	11.0	0.47	N	76.73	20.00	2.91	−	74.18	58.55	79.64	−
379	D	IV	16	10.5	0.37	N	79.93	21.15	2.87	−	67.74	60.57	121.15	−
393	E	IV	13	10.7	0.52	K	106.97	29.92	44.67	−	64.89	67.62	66.53	−
406	D	IV	17	11.1	0.60	N	93.08	35.38	6.54	−	67.69	56.15	100.77	−
448	D	IV	17	10.8	0.34	N	98.00	11.50	8.00	−	81.00	58.50	90.00	−
449	E	IV	17	6.7	0.57	N	91.09	18.22	11.74	−	53.85	43.72	99.19	−
450	E	IV	13	11.3	0.32	N	83.06	20.66	6.61	−	65.70	54.13	92.56	−
451	E	IV	16	12.3	0.40	N	127.81	27.27	4.28	−	90.37	67.91	164.17	−
452	E	IV	17	11.7	0.42	N	77.70	20.45	5.58	−	75.84	59.85	110.04	−
454	E	IV	20	11.6	0.58	N	103.76	26.92	37.19	−	55.43	60.35	81.77	−
456	E	IV	16	10.2	0.87	N	90.61	19.18	4.08	−	59.18	58.37	85.71	−
457	E	IV	16	11.2	0.60	N	118.92	45.27	10.14	−	87.16	64.19	124.32	−
458	E	IV	15	10.7	0.43	N	64.78	15.38	4.05	−	63.97	46.15	82.59	−
460	E	IV	16	10.9	0.64	K	90.51	25.69	4.35	−	62.85	67.98	68.77	−
461	E	IV	16	11.2	0.59	N	77.19	28.07	4.91	−	80.35	52.28	82.81	−
462	E	IV	16	10.5	0.51	N	62.79	30.23	3.32	−	70.76	58.14	80.73	−
463	E	IV	16	10.8	0.29	N	−	95.60	35.20	24.80	84.80	72.40	86.40	95.20
464	E	IV	18	11.3	0.44	N	83.52	80.28	56.34	−	74.51	64.23	150.00	−
465	E	IV	15	11.1	0.46	N	27.12	7.63	5.93	−	64.41	22.88	222.88	−
468	E	IV	18	10.6	0.50	N	97.71	78.63	6.87	−	73.66	68.70	97.33	−
469	E	IV	18	10.8	0.35	N	90.63	73.44	7.81	−	72.27	51.17	100.78	−
470	E	IV	17	12.0	0.49	N	96.02	82.07	7.97	−	79.68	74.50	99.60	−
471	E	I	16	11.5	0.26	N	88.14	94.92	5.08	−	81.02	45.08	100.34	−
472	E	IV	18	12.0	0.22	N	76.08	73.20	22.19	−	69.45	46.40	90.49	−
473	E	IV	18	11.3	0.15	K	87.33	84.40	45.96	−	81.62	63.51	111.56	−
474	E	IV	17	11.8	0.26	N	103.95	79.05	6.72	−	73.52	10.67	106.32	−
475	E	IV	14	9.6	0.18	N	100.40	79.92	9.64	−	81.12	68.27	112.45	−

(Continued)

**Table 2** (Continued)

G	C	FP	FD	%E	VA	K	5%E	8%E	12%E	18%E	20%S	30%S	pH 3-0	pH 3-4
476	E	IV	16	10.6	0.24	N	92.11	72.56	9.02	—	73.31	67.67	145.11	—
488	E	I	16	11.7	0.53	N	89.38	79.12	12.45	—	77.29	68.50	112.09	—
489	E	I	17	11.4	0.34	N	87.25	76.14	9.15	—	79.41	43.46	106.54	—
490	E	III	18	11.0	0.26	N	—	134.57	2.66	0.53	106.38	90.43	129.79	138.30
491	E	III	17	10.9	0.47	K	—	105.15	53.76	24.79	91.61	57.44	114.87	128.57
492	E	III	16	10.9	0.43	K	—	98.02	12.25	5.53	75.49	47.83	104.35	101.58
493	E	III	18	11.6	0.56	N	—	95.74	9.79	5.53	71.91	51.49	110.64	104.26
494	E	III	16	12.0	0.92	N	—	86.89	6.15	20.49	70.49	45.49	88.93	104.92
495	E	III	16	10.5	0.25	N	—	103.57	7.14	13.39	72.32	45.09	100.00	113.84
496	E	III	16	10.4	0.39	N	—	119.02	6.52	1.63	89.67	36.96	103.26	129.35
497	E	III	18	11.1	0.45	N	—	107.02	47.52	2.48	85.95	55.37	82.64	108.26
499	E	III	17	10.9	0.31	N	—	105.76	7.41	7.41	85.60	64.61	107.82	106.17
501	E	III	17	9.7	0.52	K	—	88.31	19.05	2.16	71.00	62.77	109.96	110.39
502	E	III	17	13.4	1.21	N	—	99.53	2.79	2.79	71.16	64.19	100.93	111.63
503	F	IV	18	10.6	0.47	N	—	101.90	21.33	10.43	74.88	63.98	99.05	113.27
504	F	III	18	10.6	0.43	K	—	103.72	26.05	23.72	70.23	71.16	107.44	116.74
505	F	II	17	8.9	0.43	N	115.79	103.40	16.99	—	90.35	81.58	96.05	120.39
506	F	I	17	11.6	0.23	N	—	92.68	41.87	0.00	76.42	67.89	100.41	106.50
507	F	II	22	11.4	0.23	K	80.19	11.14	31.64	—	66.02	67.26	94.91	—
508	F	II	22	13.4	0.41	N	92.46	73.41	8.33	—	72.62	65.08	97.22	—
509	F	III	18	10.9	0.25	N	100.00	78.41	8.37	—	77.09	70.93	111.45	—
510	F	III	18	11.6	0.48	N	94.42	78.54	4.72	—	76.39	69.10	106.87	—
511	F	III	18	13.7	0.59	N	89.70	69.96	4.72	—	74.25	66.09	103.43	—
512	F	III	17	10.8	0.40	N	96.12	59.91	8.62	—	72.41	75.43	115.95	—
513	F	III	21	12.2	0.52	N	101.27	74.68	4.64	—	81.01	81.43	105.06	—
514	F	IV	18	11.9	1.30	N	72.20	69.31	3.97	—	79.06	−0.36	66.43	—
515	F	IV	20	11.9	0.72	N	75.11	94.42	46.21	—	83.40	70.82	114.16	—
516	F	II	15	11.9	0.33	N	—	103.83	39.62	23.74	81.44	73.34	108.25	128.57
517	F	IV	17	11.4	0.54	N	—	95.28	1.42	−2.36	85.85	81.60	115.57	119.81
518	F	III	16	10.0	0.37	N	—	98.59	12.21	−0.94	81.22	80.75	105.16	107.98
519	F	IV	17	12.0	0.23	N	—	148.54	−1.17	1.75	101.17	85.96	142.11	149.12
520	F	IV	15	11.0	0.62	N	—	141.67	10.26	0.00	110.90	101.92	151.28	162.82
521	F	IV	18	12.7	0.39	N	—	150.63	4.37	6.88	117.50	110.00	158.75	150.31
522	F	IV	17	10.6	0.54	N	—	140.49	0.00	1.23	113.50	98.16	153.99	—
523	E	I	20	10.9	0.63	N	86.24	26.15	2.75	—	81.19	61.47	97.25	—
524	E	II	17	11.2	0.59	N	99.17	81.33	14.11	—	75.52	66.80	108.71	—
528	F	III	19	12.1	0.65	N	94.86	76.68	7.11	—	75.49	62.85	105.93	—
529	F	III	18	11.8	0.46	N	89.92	86.05	5.04	—	80.23	67.05	95.35	—
531	F	I	16	11.2	0.35	N	95.08	76.52	4.55	—	67.42	66.29	112.50	—

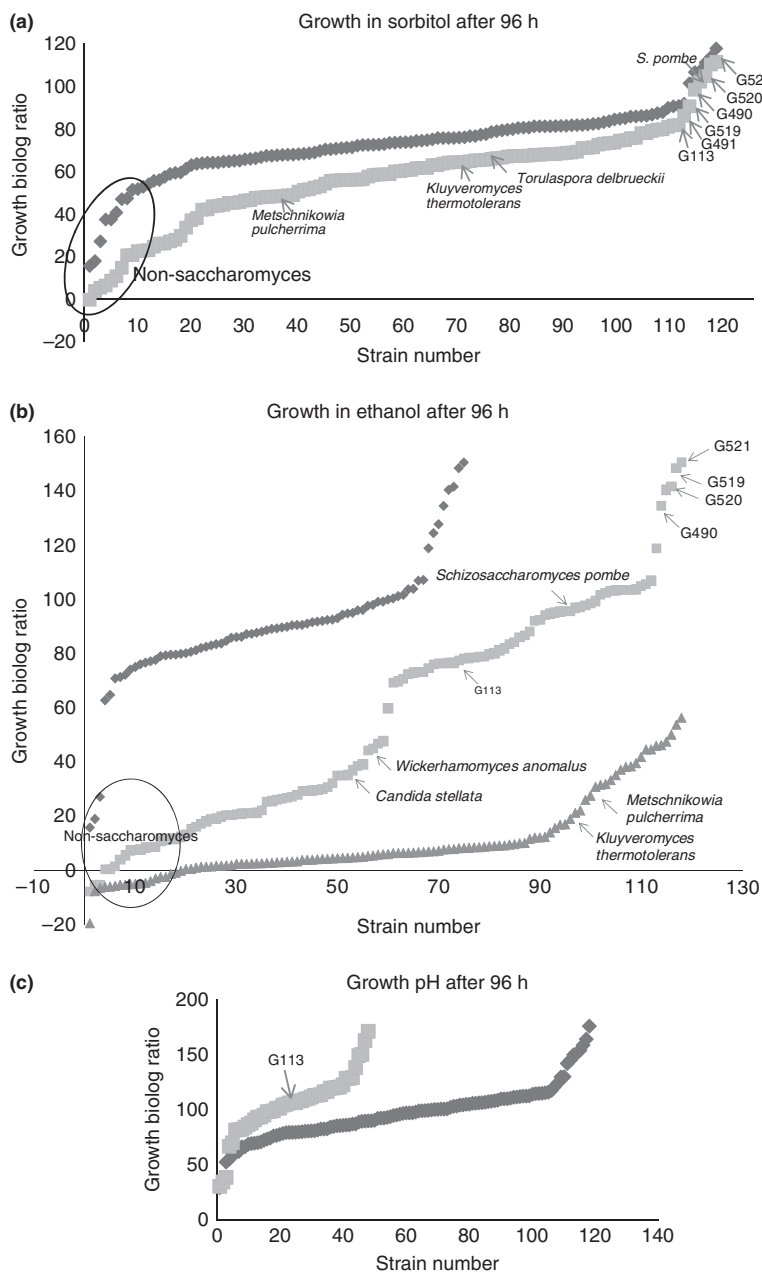
G, genotype; C, cellar; FP, phase fermentative; FD, days of fermentation; AD, alcoholic degree % ethanol (v/v); VA, volatile acids (g l<sup>−1</sup>); K, killer phenotype (k. killer positive. N neutral); 5E, biologic ratio in 5% ethanol; 8E, biologic ratio in 8% ethanol; 13E, biologic ratio in 13% ethanol; 18E, biologic ratio in 18% ethanol; 20S, biologic ratio in 20% of sorbitol; 30S, biologic ratio in 30% sorbitol; pH 3-0, biologic ratio in pH 3-0; pH 3-4, biologic ratio in pH 3-4. —, not analysed. All the assays were done by triplicate with must I. CV of the averages did not exceed 8% in all cases.

strain dependent and a Tukey test revealed that yeast from cellar F was statistically different in the presence of 8% ethanol when compared with yeast from other cellars.

#### Yeast strains isolated displayed excellent tolerance to low pH

When assessing tolerance to acidic pH, we observed that *Saccharomyces* displayed excellent metabolic output in assays with a starting pH of either pH 3-0 or 3-4,

including the commercial genotypes G113 and G10 (Fig. 1c). Assays with a starting pH of 3-0, normally considered the lower limit for the development of wine yeasts, were characterized by a 60% reduction in metabolic output when compared with assays with a starting pH of 7 (Fig. 1c). At pH 3-4, the normal pH value of the musts from grapes grown in warm climates, such as the Garnacha and Tempranillo grapes, yeast did not display sensitivity when compared with assays starting at pH 7. The non-*Saccharomyces* strains



**Figure 1** (a) Metabolic output (expressed as redox signal intensity) for 94 genotypes of *Saccharomyces cerevisiae* and 29 non-*Saccharomyces* strains after 96 h under osmotic pressure conditions with 20% sorbitol and 30% sorbitol. (b) Metabolic output for genotypes of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains after 96 h under stress conditions with 5%, 8%, 13% and 18% ethanol. (c) Metabolic output for genotypes of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains after 96 h under two values of pH: 3.0 and 3.4. a: (◆) 20% Sorbitol and (■) 30% Sorbitol. b: (◆) 5% Ethanol; (■) 8% Ethanol and (▲) 13% Ethanol. c: (◆) pH3 and (■) pH3.4.

displayed the same trend, although there were a greater number of sensitive strains to stress caused by low pH (Fig. 1c); this effect was particularly observed from yeast within the genera *Debaryomyces*, *Wickerhamomyces*, *Rhodotorula*, the species *P. toletana* and one strain of *M. pulcherrima*. There were significant differences for wineries, depending on the behaviour of the yeast strains at pH 3.0.

#### Performance of the genotypes of *Saccharomyces* in alcoholic fermentation

To discriminate more clearly between strains, in terms of their fermentative behaviour, microvinifications were conducted under suboptimal conditions using an original must (I) containing low amounts of nitrogen, 160 g l<sup>-1</sup> NFA (Ivorra *et al.* 1990). The results of these experiments



are shown in Table 2. The data obtained revealed that most of the autochthonous strains were capable of completing the vinification, although there were differences in the time required, which ranged from 13 to 22 days. The days of fermentation refers to the time required to complete the fermentation successfully (when residual sugar is below  $4 \text{ g l}^{-1}$ ). For strains G3, G8, G12, G17 from cellar A, G449, G475 from cellar E and G501 and G505 from cellar F, fermentation stopped at  $8\text{--}18 \text{ g l}^{-1}$  residual sugar. G505 was the least fermentative strain and had the highest concentration of residual fructose at around  $20 \text{ g l}^{-1}$ . The commercial strain G113 completed the vinification in 18 days, the content of alcohol was 12.2% and the production of volatile acids was between the lower values in this study,  $0.25 \text{ g l}^{-1}$  expressed as acetic acid.

The determination of volatile acids, expressed as  $\text{g l}^{-1}$  acetic acid, in the wines analysed revealed that levels were acceptable except for the genotypes: G2, G9, G18 cellar A, G456, G494 cellar E and G515 cellar F, which had values higher than  $0.6 \text{ g l}^{-1}$ . Genotypes G502 and G514 produced in excess of  $1 \text{ g l}^{-1}$  acetic acid; these genotypes exhibited poor resistance to osmotic stress.

When killer activity was analysed, strains with killer phenotype were isolated from organic cellars A, E and F which are sites of spontaneous fermentation; although the percentage did not exceed 10.3%. Under the study conditions, the majority of the strains analysed had a neutral phenotype and we failed to isolate a strain sensitive to the killer toxin.

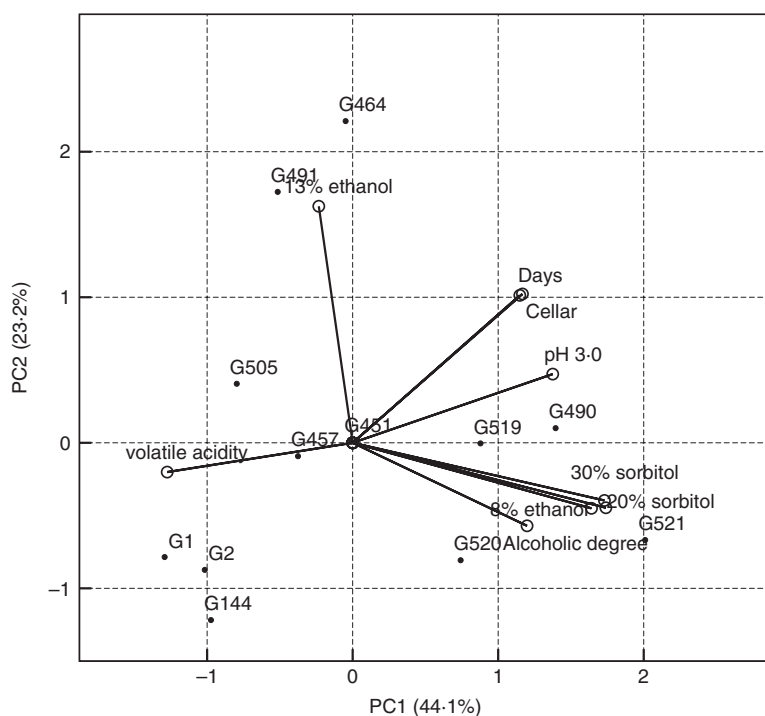
#### Selection of strains of non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* resistant to stress inherent to fermentation

Using the criteria of strains having a higher metabolic output ratio (PM assays, data not shown) under stress conditions, the best non-*Saccharomyces* strains came from the *Kluyveromyces*, *Torulaspora* and *Metschnikowia*. These yeasts displayed tolerance to osmotic stress, and *S. pombe* which was observed to be tolerant to the presence of 8% ethanol. This species shows rapid malic deacidification converting malic acid to ethanol and  $\text{CO}_2$  (Benito *et al.* 2014).

PCA was applied to the matrix of multivariate data comprising the results of fermentation days, alcohol degree, volatile acidity, metabolic output ratio under 8% ethanol, 13% ethanol, 20% sorbitol, 30% sorbitol and pH 3.0 stress (Table 2) for each of the genotypes of *Saccharomyces* from organic cellars (A, E and F). The highest ranking was for winery F with 80.07% of the variance explained by three main factors. The first component was determined by the resistance to alcoholic strength, osmotic pressure with sorbitol and pH 3. The second

component is defined by days of fermentation and production of volatile acids. In cellar E, the variability explained by the components obtained was lower, with 58.7% of the total variance explained. The variables that have the greatest weight in the ranking were alcoholic strength, resistance to osmotic pressure and volatile acids. In the case of cellar A, these variables accounted for 76.1% of the total variance observed. The first component is related to the osmotic pressure resistance and the production of volatile acids. The second factor in this classification is more related to alcoholic strength. Building on these results we determined a reduced list of more stress resistant strains of *S. cerevisiae*: cellar E (G451, G457, G464, G490 and G491), cellar F (G505, G519, G520 and G521) and cellar A (G1, G2 and G144). The data related to the selected genotypes analysed together resulted in the spread of five principal components. The PC1, PC2 and PC3 accounted for 83.7% of total variance (Fig. 2). Along the two principal components the strains were grouped in three clusters. Genotypes G490, G519, G520 and G521 were grouped in the cluster on the right part of the plot. The loading of each variable on the PCA showed that alcoholic degree, 8% ethanol, 20% sorbitol, 30% sorbitol and pH are mainly responsible for this cluster. Whereas, 13% ethanol characterizes the strains G491 and G464, located in the top left of the plot. Volatile acidity is more related to the cluster G1, G2 and G144 strains in the bottom left. Strains G457 and G451 focused more on the plot are dependent on a greater number of variables. Genotype G505 is a strain best defined by other variables not included in the PCA.

To analyse the chemical, aromatic and sensory characteristics of the wines produced on a larger scale (5 l) with pure cultures, the 12 preselected strains were subjected to analysis of their behaviour under standard fermentation conditions using sterile must II, whose composition emulated the must obtained in warmer conditions. Acetic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, tartaric acid, glucose, fructose and glycerol levels were determined and significant differences amongst the strains were determined. As a control for these studies the autochthonous selected strain CLI 889 was used (Table 3). All strains consumed the available sugars with the exception of G505 which had a residual fructose content of  $22 \text{ g l}^{-1}$ . The rate of ethanol production was between  $9.2^\circ$  (G505) and  $13.1^\circ$  (G144). The acetic acid content from the fermentations was within the accepted limits for the production of wine ( $<1 \text{ g l}^{-1}$ ) (Erasmus *et al.* 2004), except for G2 which had concentrations of acetic acid ( $0.8 \text{ g l}^{-1}$ ), the lower value corresponding to the autochthonous CLI 889 strain was  $0.35 \text{ g l}^{-1}$ . With the exception of killer strain G451, all the selected strains showed a neutral killer phenotype. The commercial strains G10



**Figure 2** Principal component analysis using as variables the data obtained by the chemical analysis of must fermentation and the phenotypic characterization to the stress resistance with the *Saccharomyces cerevisiae* strains (PC1 against PC2). (i) In cellars A, E and F. (ii) For the 12 more resistant *S. cerevisiae* strains. The projection on the plan of the different variables is indicated in the plot by lines.

and G113 showed good adaptation to the stress conditions, but were not comparable to the values obtained with these selected strains.

Assessing for the production of glycerol we observed that G2, G505, G1 and G490 were strains with a higher production of glycerol 13.8, 8.0, 6.7 and 6.2 g l<sup>-1</sup>, respectively. The presence of malic acid indicated that the strains did not consume a significant amount of this compound, and therefore lactic acid levels were not elevated and levels of tartaric and succinic acid were within normal values reported for wine (Erasmus *et al.* 2004). A fermentation using G505 was characterized by higher concentrations of tartaric acid, which could be related to poor ethanol production; as this strain produced the lowest ethanol production for yeast assayed in this experiment.

The wines resulting from the fermentation study of the selected yeasts and the strain CLI 889 were submitted to analysis of the major volatile compounds. The 32 studied volatiles were grouped in four families: 'alcohols', 'acids', 'esters', 'aldehydes and ketones' (Table 4). The ANOVA analysis showed the existence of significant differences ( $P < 0.05$ ) between all strains to all the compounds, with the exception of Z-3-hexenol, benzaldehyde, butyric acid and hexyl acetate. In general, all the strains produced a good level of aromatic compounds in relation to strain CLI 889. The synthesis of these compounds was high for

all selected strains, but was more relevant to genotypes G1, G2 and G491. All compounds giving quality to the aroma were over the threshold of human olfaction with an odor activity value of  $>1$  (OAV): Z-3-hexenol (herbal),  $\beta$ -phenylethanol (rose), ethyl isobutyrate (tropical fruit), ethyl hexanoate, ethyl octanoate (fruit). Strains G491 and G144 showed the highest alcohol values with a relevant importance of the flowery aroma  $\beta$ -phenylethanol. Strain CLI 889 presented the lowest alcohol value, especially with regard to isoamyl alcohols. In terms of ester compounds, genotype G464 was highlighted for the production of the tropical fruity character of ethyl isobutyrate and the banana aroma of isoamyl acetate, being of similar concentration to the second more aromatic genotype G 144 and very similar to the CLI 889 strain. It is noteworthy that although CLI889 was not higher in terms of the total ester content, it contained the highest values for the major fresh-fruity aroma compounds: ethyl hexanoate, 3-OH ethyl butyrate and ethyl octanoate. Concerning the acids, all genotypes presented values that contribute to the quality of the wine. The highest content was isobutyric acid (8.97 mg l<sup>-1</sup>) with G464 when compared with the average content of other strains (2.89 mg l<sup>-1</sup>), but this value is below the odour threshold (20 mg l<sup>-1</sup>). For aldehydes and ketones, G144 is the greater producer of diacetyl (0.93 mg l<sup>-1</sup>) followed by CLI889 (0.63 mg l<sup>-1</sup>). G491 together with G464 and



**Table 3** Fermentative parameters of the strains of *Saccharomyces cerevisiae* more resistant to the stress fermentative conditions and the control strain CLI889

Strain	Cellar	Zone	PF	FD	AD	VA	G	F	GI	AA	CA	TA	MA	SA	LA
CLI889	Control	A	IV	12	12.2 ± 0.2	0.25 ± 0.08	0	1.27 ± 0.20	4.36 ± 1.90	0.30 ± 0.06	0.37 ± 0.08	3.49 ± 0.08	0.95 ± 0.04	1.79 ± 0.40	0.35 ± 0.02
G1	A	SM	IV	12	11.6 ± 0.2	0.55 ± 0.05	0.14 ± 0.00	1.57 ± 0.30	6.71 ± 1.70	0.47 ± 0.14	0.31 ± 0.08	3.56 ± 0.09	0.99 ± 0.23	2.45 ± 0.62	0.24 ± 0.08
G2	A	SM	IV	12	11.9 ± 0.4	0.80 ± 0.06	0	2.21 ± 0.12	13.78 ± 0.76	0.69 ± 0.04	0.55 ± 0.05	5.76 ± 0.09	1.43 ± 0.11	1.44 ± 0.04	0.36 ± 0.02
G144	A	SM	IV	13	13.1 ± 0.5	0.49 ± 0.06	0.37 ± 0.00	9.39 ± 2.82	5.50 ± 0.03	0.34 ± 0.00	0.41 ± 0.01	2.97 ± 0.01	1.04 ± 0.45	1.84 ± 0.02	0.38 ± 0.00
G451	E	SM	IV	13	12.7 ± 0.3	0.45 ± 0.04	0	0.89 ± 0.06	5.80 ± 0.14	0.55 ± 0.01	0.28 ± 0.00	2.92 ± 0.15	0.78 ± 0.04	2.02 ± 0.18	0.22 ± 0.01
G457	E	SM	IV	12	12.4 ± 0.7	0.65 ± 0.03	0	1.06 ± 0.55	5.30 ± 1.72	0.58 ± 0.14	0.38 ± 0.18	2.87 ± 1.16	0.78 ± 0.32	1.80 ± 0.76	0.14 ± 0.10
G464	E	SM	IV	12	12.3 ± 0.6	0.51 ± 0.06	0	4.97 ± 0.21	4.67 ± 0.73	0.34 ± 0.04	0.46 ± 0.08	2.65 ± 0.38	1.21 ± 0.16	1.92 ± 0.27	0.26 ± 0.05
G490	E	SM	III	13	12.0 ± 0.4	0.36 ± 0.08	0	0.97 ± 0.00	6.21 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.27 ± 0.01	2.85 ± 0.03	0.74 ± 0.01	1.87 ± 0.03	0.18 ± 0.01
G491	E	SM	III	12	11.0 ± 0.5	0.49 ± 0.02	0	1.08 ± 0.04	5.66 ± 0.12	0.34 ± 0.03	0.50 ± 0.03	3.04 ± 0.05	0.85 ± 0.01	1.94 ± 0.06	0.18 ± 0.00
G505	F	A	III	14	9.2 ± 0.3	0.54 ± 0.06	1.35 ± 0.12	22.60 ± 0.56	8.03 ± 0.02	0.49 ± 0.09	0.56 ± 0.04	5.08 ± 0.01	1.19 ± 0.00	2.84 ± 0.15	0.11 ± 0.01
G519	F	A	IV	12	12.3 ± 0.4	0.35 ± 0.02	0	0.97 ± 0.02	4.61 ± 0.06	0.24 ± 0.01	0.28 ± 0.09	2.52 ± 0.02	0.78 ± 0.01	1.65 ± 0.00	0.12 ± 0.00
G520	F	A	IV	13	12.5 ± 0.6	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.00	0.93 ± 0.01	4.62 ± 0.16	0.38 ± 0.03	0.31 ± 0.02	2.65 ± 0.11	0.71 ± 0.04	1.80 ± 0.07	0.14 ± 0.01
G521	F	A	IV	13	12.7 ± 0.4	0.45 ± 0.03	0	0.87 ± 0.03	4.51 ± 0.14	0.40 ± 0.00	0.28 ± 0.00	2.69 ± 0.02	0.73 ± 0.01	1.69 ± 0.02	0.16 ± 0.00

PF, fermentative phase; FD, fermentation days; AD, alcohol degree v/v; VA, volatile acids (g l<sup>-1</sup>); G, glucose (g l<sup>-1</sup>); AA, fructose (g l<sup>-1</sup>); CA, glycerol (g l<sup>-1</sup>); Acetic acid (g l<sup>-1</sup>); Tartaric acid (g l<sup>-1</sup>); Malic acid (g l<sup>-1</sup>); Succinic acid (g l<sup>-1</sup>); Lactic acid (g l<sup>-1</sup>).

G521 are higher producers of acetone. The positive contribution of diacetyl and acetoin to the aroma when both are present at a lower OAV of 0.1 and 1 mg l<sup>-1</sup>, respectively, is remarkable. In relation to phenylacetaldehyde that is negatively correlated with wine quality, CLI 889 is richer in this compound. The G519 and G520 strains produced less.

The wines made with the strains better adapted to the stress fermentation conditions were submitted to qualitative sensory analysis. The average score obtained for the 13 wines for their appearance, odour, taste and their overall quality properties, had significant differences among them. The sensory profiles of the tested yeasts are shown in Fig. 3. Wines made from selected yeasts are different in many sensory aspects, including high floral and fruity notes and similar in a moderate intensity of acid and alcohol and low values for herbal, microbiologic and phenolic notes. G1, G2, G144, G491 and G521 were noted for the floral notes, G1, G2, G451, G521, G490, G144, G464 and CLI889 presented higher values for the fruity aroma. The sum of these descriptors defines the overall intensity and quality of the wines. The tasters did not detect unpleasant smells or oxidation notes. The G2 was the genotype with higher notes of the chemical descriptors mainly due to the high content of acetic acid; this compound is perceived by the human olfactory sense as an irritant and spicy smell. Of the strains better rated by the panel, G464 was well defined for the content of higher alcohols, isobutanol and  $\beta$ -phenylethanol, at the time this strain produced higher values of ethyl isobutyrate and isobutyric acid. G144 presented a higher content in higher alcohols (342.69 mg l<sup>-1</sup>) and a marked content of ethyl ester.

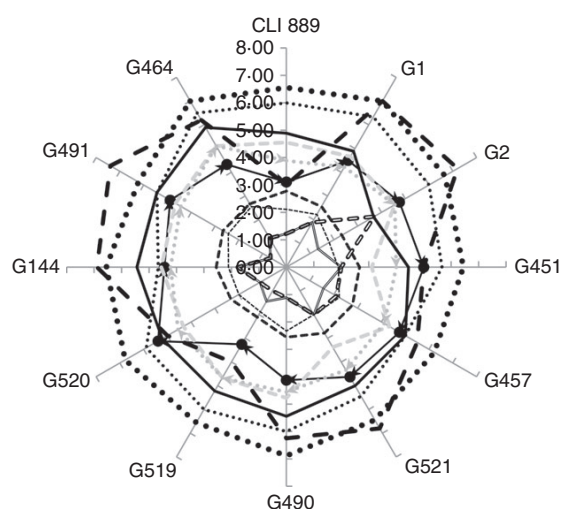
## Discussion

Climate change has brought about a number of important challenges to winemaking associated with grape composition, amongst which are advanced harvest times and temperatures, and increased sugar content inherent to the grape (Mira de Orduña 2010; Loira *et al.* 2011). One of the strategies used to mitigate these effects in wines is to study the behaviour of yeast in these areas and to identify strains suitable for future wine production in order to maintain wine quality (Mira de Orduña 2010). In this paper, we studied 94 autochthonous *Saccharomyces* genotypes and 29 non-*Saccharomyces* strains isolated from musts and wines from cellars found in the Denomination of Origin 'Vinos de Madrid'. Recently, there has been an increase in the use of autochthonous or locally selected yeasts for the control of must fermentation, because these strains are adapted to all the conditions associated with a specific wine-production area (Tello *et al.* 2012; Tristezza

**Table 4** Volatile compounds (mg l<sup>-1</sup>), OTV (odour threshold value, Balboa-Lagunero *et al.* 2013) mg l<sup>-1</sup> and descriptors of the wines made with the selected stress resistant yeasts and control strain CLI 889

Compound	OTV	Descriptor	G1	G144	G2	G505	G519
1-Propanol	9	Alcohol, ripe fruit	3.45 ± 0.1	4.6 ± 0.22	7.07 ± 0.03	6.22 ± 1.34	5.55 ± 0.83
1-Butanol	150	Soap, fatty, diesel	0.68 ± 0.03	1.01 ± 0.16	0.79 ± 0.03	0.79 ± 0.23	0.38 ± 0.22
Isobutanol	40	Bitter, fusel, stable, cheese	38.19 ± 1.68	31.52 ± 0.18	27.94 ± 0.03	28.13 ± 6.15	21.53 ± 3.24
Isoamyl alcohol	30	unpleasant, feet, cheese, Rancid, fusel	183.55 ± 3.56	230.69 ± 13.21	183.47 ± 0.03	136.41 ± 25.16	136.43 ± 17.45
(Z)-3-Hexen-1-ol	0.4	Lemon, fresh, air freshener	0.1 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.04
1-Hexanol	8	Green, bitter, almond, grass, fresh	0.56 ± 0.03	0.78 ± 0.07	0.52 ± 0.03	0.45 ± 0.1	0.78 ± 0.21
Metionol	1	Garlic	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0.03	0 ± 0	0 ± 0
Benzyl alcohol	200	Pleasant, soft	0 ± 0	0.02 ± 0	0.02 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.04
β-Phenylethyl alcohol	14	Flowery, roses, jasmine	85.74 ± 2.31	73.89 ± 5.33	88.33 ± 0.03	69.62 ± 13.82	62.44 ± 2.26
Σ Alcohols			312.27 ± 7.72	342.62 ± 19.18	308.23 ± 0.27	241.75 ± 46.82	227.3 ± 24.29
Ethyl butyrate	0.02	Fruity, sweet syrup, apple	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.02
Ethyl isovalerate	0.003	Fruity, sweet, banana	0.45 ± 0.06	0.55 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.4 ± 0.11	0.41 ± 0.06
Ethyl isobutyrate	0.015	Fruity, pineapple	2.63 ± 0.09	3.09 ± 0.23	2.54 ± 0.03	3.05 ± 0.62	1.41 ± 0.11
Isoamyl acetate	0.03	Banana, sweet, fruity	0.82 ± 0.05	1 ± 0.16	0.91 ± 0.03	0.62 ± 0.16	0.85 ± 0.05
Ethyl hexanoate	0.014	Pineapple, tropical fruits, apple	0.31 ± 0.06	0.41 ± 0.1	0.33 ± 0.03	0.47 ± 0.08	0.48 ± 0.03
Ethyl-3-hydroxybutyrate	20	Fruity	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.19 ± 0.07	0.15 ± 0.01
Hexyl acetate	1	Sweet, fruity, green	0.04 ± 0	0.04 ± 0	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0	0.05 ± 0.02
2-Phenylethyl acetate	0.25	Flowery, lilac	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.09	0.75 ± 0.03	0.6 ± 0.13	0.35 ± 0.32
Diethyl succinate	100	Camphor	6.46 ± 0.96	10.68 ± 2.47	10.37 ± 0.03	5.88 ± 1.41	9.29 ± 1.94
Ethyl octanoate	0.58	Fresh, pineapple, flowery, fruity	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.17 ± 0.03
Ethyl lactate	154	Sour milk	2.9 ± 0.13	4.58 ± 0.03	2.71 ± 0.03	2.04 ± 0.47	1.78 ± 0.04
Σ Esters			14.81 ± 1.5	21.37 ± 3.14	18.7 ± 0.33	13.7 ± 3.13	15.23 ± 2.63
Isobutyric acid	0.05	Rancid, butter, cheese	2.94 ± 0.07	2.33 ± 0.05	2.81 ± 0.03	3 ± 0.87	1.59 ± 0.02
Butyric acid	0.173	Butter, cheese, stinky	0.17 ± 0	0.18 ± 0	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01
Isovaleric acid	0.033	Cheese	1.1 ± 0.01	1.01 ± 0.1	1.26 ± 0.03	1.3 ± 0.31	1.16 ± 0.08
Hexanoic acid	0.42	Cheese	2.71 ± 0.19	2.69 ± 0.11	2.22 ± 0.03	2.77 ± 0.53	2.58 ± 0.34
Octanoic acid	0.5	Sweat, cheesy	1.41 ± 0.43	0.94 ± 0.06	0.92 ± 0.03	1.05 ± 0.22	0.83 ± 0.4
Decanoic acid	1	Rancid, fat	0.33 ± 0.02	0.48 ± 0.08	0.5 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.2 ± 0.11
Σ Acids			8.66 ± 0.72	7.63 ± 0.4	7.88 ± 0.18	8.54 ± 2	6.53 ± 0.96
Diacetyl	0.1	Butter	0.6 ± 0.01	0.93 ± 0.41	0.59 ± 0.03	0.45 ± 0.1	0.4 ± 0.11
Furfural	15	Bread, bakery, candy, toasty	0.12 ± 0.04	0.1 ± 0.11	0.22 ± 0.03	0.1 ± 0.03	0.07 ± 0.07
Benzaldehyde	5	Sweet, candy, wood	0.05 ± 0	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Phenylacetaldehyde	1	Roses, hyacinth	0.11 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.09
Acetoin	150	Butter	0.35 ± 0.18	0.06 ± 0.1	0 ± 0.03	0.16 ± 0.19	0.17 ± 0.23
Σ Aldehydes/Ketones			1.23 ± 0.24	1.25 ± 0.65	1.13 ± 0.15	0.86 ± 0.36	0.75 ± 0.51
γ-Butyrolactone	35	Coconut	9.08 ± 0.62	14.7 ± 2.86	14.99 ± 0.03	5.34 ± 1.03	5.58 ± 1.39

G520	G521	G451	G457	G464	G490	G491	CLI899
6.07 ± 0.18	7.47 ± 0.6	7.99 ± 0.5	7.76 ± 0.14	8.87 ± 0.64	4.3 ± 0.06	7.73 ± 0.06	3.69 ± 0.13
1.04 ± 0.13	0.61 ± 0.05	0.7 ± 0.06	0.46 ± 0.06	0.44 ± 0.19	0.6 ± 0.05	0.53 ± 0.08	0.4 ± 0.1
28.37 ± 1.08	29.85 ± 0.6	38.38 ± 1.16	49.9 ± 0.91	57.69 ± 0.4	24.86 ± 0.75	36.41 ± 3.42	26.3 ± 0.95
168.05 ± 0.98	164.27 ± 5.09	180.89 ± 3.52	154.56 ± 0.27	159.4 ± 4.78	138.92 ± 1.66	193.66 ± 22.53	91.37 ± 3.14
0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.06	0.07 ± 0.06	0.1 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.2 ± 0.1
0.5 ± 0.05	0.49 ± 0.03	0.57 ± 0.06	0.51 ± 0.07	0.43 ± 0.17	0.57 ± 0.06	0.52 ± 0.09	0.88 ± 0.05
0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.08 ± 0.13	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.61 ± 0.1
0.05 ± 0.05	0 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.15 ± 0.06
67.7 ± 2.26	76.44 ± 0.92	63.85 ± 0.54	76.86 ± 4.54	72.51 ± 6.37	48.66 ± 1.27	86.34 ± 9.08	10.53 ± 0.29
271.9 ± 4.78	279.21 ± 7.35	292.46 ± 5.9	290.25 ± 6.22	299.44 ± 12.63	218.08 ± 3.88	325.33 ± 35.29	134.13 ± 4.92
0.33 ± 0.06	0.28 ± 0.03	0.17 ± 0.06	0.2 1 ± 0.06	0.14 ± 0.12	0.25 ± 0.04	0.26 ± 0	0.31 ± 0.05
0.52 ± 0.08	0.42 ± 0.04	0.45 ± 0.05	0.48 ± 0.06	0.36 ± 0.17	0.4 ± 0.05	0.47 ± 0.03	0.28 ± 0.05
3.25 ± 0.32	1.92 ± 0.22	2.99 ± 1.02	4.17 ± 0.34	8.61 ± 0.29	3.19 ± 0.16	2.42 ± 0.25	2.6 ± 0.37
1.08 ± 0.05	0.87 ± 0.06	0.84 ± 0.14	0.67 ± 0.06	0.63 ± 0.17	0.52 ± 0.04	0.96 ± 0.05	0.99 ± 0.05
0.66 ± 0.06	0.51 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.43 ± 0.09	0.3 ± 0.17	0.4 ± 0.01	0.5 ± 0.03	0.7 ± 0.06
0.21 ± 0.07	0.2 ± 0.04	0.07 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.1 ± 0.09	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.07	0.32 ± 0.06
0.08 ± 0.05	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.05
0.8 ± 0.05	0.8 ± 0.09	0.57 ± 0.06	0.6 ± 0.06	0.57 ± 0.17	0.39 ± 0.02	0.91 ± 0.02	0.76 ± 0.09
9.6 ± 0.57	8.22 ± 0.33	6.5 ± 0.71	6.79 ± 1.15	6.54 ± 1.26	7.01 ± 0.44	8.52 ± 2.72	6.57 ± 0.13
0.26 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.1 ± 0.06	0.16 ± 0.06	0.12 ± 0.1	0.15 ± 0.02	0.21 ± 0	0.51 ± 0.06
2.33 ± 0.2	2.38 ± 0.11	3.19 ± 0.39	2.23 ± 0.22	2.41 ± 0.21	1.78 ± 0.06	1.57 ± 0.5	3.32 ± 0.11
19.12 ± 1.56	15.81 ± 1.01	15.21 ± 2.62	15.9 ± 2.2	19.81 ± 2.78	14.33 ± 0.87	16.08 ± 3.68	16.43 ± 1.08
3.12 ± 0.53	2.32 ± 0.1	3.71 ± 0.17	4.79 ± 0.1	8.97 ± 0.53	2.93 ± 0.17	3.13 ± 0.15	2.89 ± 0.05
0.22 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.13 ± 0.05	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.09	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.06
1.91 ± 0.15	1.4 ± 0.04	1.48 ± 0.06	1.28 ± 0.11	1.64 ± 0.2	1.18 ± 0.02	1.34 ± 0.15	0.74 ± 0.06
3.16 ± 0.07	2.82 ± 0.12	1.75 ± 0.09	2.58 ± 0.06	2.13 ± 0.18	2.47 ± 0.13	2.74 ± 0.06	3.11 ± 0.34
1.21 ± 0.09	1.22 ± 0.04	0.82 ± 0.14	1.12 ± 0.07	1.01 ± 0.17	1.22 ± 0.1	1.26 ± 0.02	2.18 ± 0.05
0.4 ± 0.06	0.4 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.22 ± 0.07	0.32 ± 0.18	0.19 ± 0.08	0.45 ± 0.09	0.73 ± 0.09
10.02 ± 0.95	8.34 ± 0.36	8.13 ± 0.56	10.13 ± 0.47	14.18 ± 1.35	8.14 ± 0.52	9.1 ± 0.48	9.88 ± 0.65
0.57 ± 0.06	0.41 ± 0.07	0.53 ± 0.08	0.53 ± 0.06	0.41 ± 0.19	0.57 ± 0.06	0.53 ± 0.03	0.63 ± 0.09
0.24 ± 0.08	0.04 ± 0.07	0.12 ± 0.06	0.1 ± 0.06	0.09 ± 0.08	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.07 ± 0.05
0.1 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.05	0.06 ± 0.05	0.06 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.0	0.09 ± 0.05
0.15 ± 0.05	0.27 ± 0.19	0.14 ± 0.05	0.35 ± 0.18	0.17 ± 0.15	0.13 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.52 ± 0.05
0.32 ± 0.3	0.68 ± 0.08	0.17 ± 0.18	0 ± 0	0.72 ± 0.23	0.45 ± 0.36	0.94 ± 0.03	0.2 ± 0.1
1.38 ± 0.54	1.44 ± 0.44	1 ± 0.42	1.04 ± 0.35	1.45 ± 0.7	1.36 ± 0.49	1.93 ± 0.14	1.51 ± 0.34
10.45 ± 0.68	9.06 ± 0.04	11.85 ± 0.26	11.82 ± 1.89	15.71 ± 1.18	14.03 ± 0.46	10.56 ± 1.15	9.4 ± 0.1



**Figure 3** Cobweb diagram of the sensory score of wines prepared with the selected yeasts G1, G2, G451, G457, G521, G490, G520, G144, G464 and the control strain CLI889. (.....) Fruity; (-----) Chemical; (-----) Herbal; (—) Microbiologic; (—) Phenolic; (—) Sweet; (—) Acid; (—) Overall intensity; (—) Alcoholic; (—) Overall quality and (---) Floral.

*et al.* 2012). In this study we employed a phenotypic microarray technology assay to study the behaviour and adaptation of yeast to stresses inherent to fermentation. This technology allows for culture in small volumes providing the opportunity to perform many parallel assays in a compact time and space (DeNittis *et al.* 2010).

One of the stress conditions that yeast cells have to cope with at the beginning of alcoholic fermentation is osmotic stress due to the high sugar concentration in the must (Coulter *et al.* 2008). In this study the ability of strains to grow under hyperosmotic conditions was tested in the presence of 20 and 30% sorbitol (a non-assimilable carbon source). The majority of media contain up to 20% of sugar, although many yeast species are able to tolerate glucose concentrations of up to 40% (Caridi *et al.* 1999; Hohmann 2002). Many studies have reported the population dynamics on the surface of sweet grapes and revealed a complex microbiota. In this sense, there are some procedures around the world implicated in the production of sweet wines, Sauternes and Tokay wines are produced by *Botrytis cinerea*, some Mediterranean countries as Greece, Cyprus, Italy and Turkey, as well as in the Montilla-Moriles winemaking region (Spain) produce sweet wines from grapes dried by sunlight exposure (López de Lerma and Peinado 2011). *Botrytis* infection stimulates a high diversity level of yeasts, and the community is likely enriched with fermentative species (Nisiotou and Nychas 2007).

When the cells are exposed to increasing osmotic stress, the cells activate different strategies to counteract the stress with the production and accumulation of glycerol as the main mechanism displayed by yeasts (Hohmann 2002). Under fermentation conditions, the strains produced on average 5–6 g l<sup>-1</sup> glycerol; however, this can increase to 12 g l<sup>-1</sup> glycerol under stressful conditions (Grieco *et al.* 2011). García-Martínez *et al.* (2013) reported values of glycerol around 17 and 22 g l<sup>-1</sup> with two selected osmotolerant yeasts isolated from spontaneously fermented Pedro Ximenez sweet musts and in white wines infected by *B. cinerea* (Calderone *et al.* 2004). The CLI 889 strain produced values of around 4 g l<sup>-1</sup>. This value was doubled and tripled by strains G490, G505 and G2, respectively. Therefore, strains of *S. cerevisiae* that increase the concentration of glycerol are of great interest for application in the wine industry.

During fermentation, the usual quantity of volatile acidity produced by *S. cerevisiae* is 0.25–0.50 g l<sup>-1</sup>, but may be higher under certain fermentation conditions and the levels may exceed legal limits (Bely *et al.* 2003). The yeast strain is a determining factor in this production, and the G502 and G514 resistance genotypes with low osmotic stress produce high amounts of acetic acid with values above 1 g l<sup>-1</sup> (Table 2). It is also known that *S. cerevisiae* produces acetic acid as a by-product of the hyperosmotic stress response to the presence of high sugar concentrations in grape must (Mira de Orduña 2010). Under stress conditions, expression model genes GPD1 and GPD2, result in an overproduction of glycerol increasing levels of acetic acid to unacceptable levels (Remize *et al.* 2003). So the search for strains that do not increase the volatile acids under osmotic stress conditions is necessary, in this case the genotypes G490 and G505 produce low volatile acids (0.2 and 0.4 g l<sup>-1</sup>). Although G2 is the strain that produces more glycerol, it shows a high concentration of acetic acid (0.8 g l<sup>-1</sup>).

Moreover, fermentations with a high starting sugar concentration and the resulting ethanol concentration can lead to microbiological, technological, sensory and financial challenges. Published data have correlated increased alcohol levels in wines from Alsace, Australia and Napa Valley with the increase in climate change (Jones 2007). The increase in the number of wines with alcohol levels about 13, 14% and even 15% by volume in the marketplace has been noticeable, as well as complaints about 'heady' or 'hot' wines by wine critics. The effect of ethanol within a wine of 10–14% ethanol content on volatile ester hydrolysis in model solutions has been reported to be low (Robinson *et al.* 2009).

*Saccharomyces* was the most ethanol tolerant species in general; however, we did observe strain variation to the

presence of ethanol; in fact only eight strains of *S. cerevisiae* were able to grow in the presence of 13% ethanol. Previous work has highlighted that strains of *Saccharomyces* were able to develop colonies on plates containing 5 and 10% ethanol; however, at 12% ethanol some strains showed difficulties and in assays using 15% ethanol only a few strains exhibited growth (Belloch *et al.* 2008). In this respect, it is known that 'flor' yeast of sherry wines can survive high ethanol concentrations of 14%–16% v/v (Alexandre 2013). In our study, all the strains would be able to grow in the presence of 5 and 8% ethanol in different ratios, but the strains do not grow well with concentrations above 13% ethanol. Nitrogen demands are strongly dependent on the strain of yeast (Martínez-Moreno *et al.* 2012). Fermentation kinetics are conditioned by the nitrogen content of the culture medium, both in speed and completion (Thaillandier *et al.* 2007), this might be one reason why ethanol resistant strains G516 and G491 were isolated in stages II and III of alcoholic fermentation in the cellars. Strain G516 has a rapid fermentation (15 days). Genotype G491, despite having phenotype killer, disappears in the early stages of fermentation when competition for nutrients can be more critical to remain in the middle phase of the fermentation.

The acidity of the grape must is also considered as important for the survival and growth of yeasts with low pH values a cornerstone for microbial stability. Higher pH values harbour the risk of increased microbial contamination mainly in the early stages of fermentation before a higher alcohol concentration leads to increased microbial stability. Starting pH values of the must above 4 are readily reached in hot climates and have also been recorded in must derived from traditionally cooler climates (Sigler 2008). The correction of the initial pH of the medium to adjust the fermentation conditions can be an additional stress. In our assay we studied yeast performance at two starting pHs (pH 3.0 and 3.4), in general, the majority of the strains were metabolically active at both pHs. Published data for yeast performance at acidic pHs are contradictory with reports of fermentation reduced at pH 3.0–3.5 (Fleet and Heard 1993). However, the pH has been shown to have little impact on the performance of *Saccharomyces uvarum* during fermentation (Serra *et al.* 2005). Similar tolerances to pH 2.8–3.2 in *Saccharomyces* have been reported previously (Belloch *et al.* 2008). These authors have concluded that a low pH should not be considered a stress factor for yeast in alcoholic fermentations.

At the end of the study, we identified 12 tolerant strains of *S. cerevisiae* based on their performance under stress conditions. The results revealed that the strains

were distributed from all over the region, although strains with greater resistance to osmotic pressure and high ethanol were isolated from the organic cellars, F from the Arganda and E from San Martín de Valdeiglesias. Strains from these areas displayed a better tolerance to the presence of 13% ethanol. These results appear to be consistent with the hypothesis of adaptation of the strains to the growth conditions in the environment in which they are specialized (Belloch *et al.* 2008). In previous studies we confirmed that different strategies such as the farming system, soil maintenance practices or grape varieties have an important influence on the natural yeast population associated with the vineyard and the cellars (Cordero-Bueso *et al.* 2011a,b).

It is well established that *S. cerevisiae* produces different concentrations of aroma compounds as a function of the fermentation conditions and must treatments, i.e. temperature, grape variety, vitamins and nitrogen composition of the must (Carrau *et al.* 2008; Balboa-Lagunero *et al.* 2013; Vararu *et al.* 2016). In order to assess the contribution of each compound to the aroma of the wine, the odor activity value (OAV) was used. Among the tested yeasts, 1-butanol, isoamyl alcohols and isobutanol were the alcohols that surpassed the detection threshold, and probably contributed to giving the wine an 'alcohol' aroma. Values of high alcohols below 300 mg l<sup>-1</sup> usually contribute to the desirable complexity of wine (Pretorius 2000). Regarding the ester profiles, ethyl butyrate, ethyl isovalerate, ethyl isobutyrate and ethyl hexanoate, ethyl octanoate presented an OAV of >1. G144, G464, G490 G520, besides CLI889, showed the highest levels of this group of volatiles. Within the acid family, isobutyric and octanoic acids were the most significant to G464 and G520. With regard to aldehydes and ketones, CLI 889 showed that phenylacetaldehyde was negatively correlated with the wine quality (Balboa-Lagunero *et al.* 2013).

As shown in the results for sensory analysis, the profiles of wines obtained are characteristic of the studied strains, the average score obtained for the 13 wines in their appearance, odour, taste and their overall quality properties, showed significant differences among them. Nevertheless, the wines obtained by fermentation with G464, G1 and G491 had the highest scores regarding the fruity and floral odour and the overall quality, indicating a predilection of the tasters towards them, being well correlated with their respective volatile components.

In a recent review, Fleet (2008) discussed the possibilities of using yeasts other than those from the *Saccharomyces* genus for future wine fermentation and the commercial viability of mixed cultures. These species have great potential to introduce appealing characteristics

to wine that may improve its organoleptic quality (Cordero-Bueso *et al.* 2013; Contreras *et al.* 2015). The results obtained for non-*Saccharomyces* (*S. pombe*, *K. thermotolerans*, *T. delbrueckii*, *C. stellata* and *M. pulcherrima*) have shown a good tolerance to the presence of osmotic, temperature and pH stress. Co-fermentations between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains would be a biotechnological alternative, increasing the enological diversity in international markets (Bely *et al.* 2003, 2008). Various authors have mentioned that indigenous yeast species, such as *K. apiculata*, *C. stellata* and *T. delbrueckii*, may have a better ability than *S. cerevisiae* to grow during fermentations conducted at high sugar concentrations (e.g.  $>200 \text{ g l}^{-1}$ ) and the ability of *Candida apicola* and *Candida zemplinina* strains to grow at 14% v/v ethanol has been noted (Tofalo *et al.* 2009). One solution to the problem of excessive volatile acidity formation in high-sugar fermentations is to use mixed cultures of *T. delbrueckii* with *S. cerevisiae*, with a higher concentration of *T. delbrueckii* to promote its growth. This mixed inoculum results in combined, rather than successive, fermentations, producing lower levels of acetic acid and acetaldehyde without affecting the glycerol content (Bely *et al.* 2008).

The expected damage from climate change will have substantial effects and this justifies the adoption of adaptation measures to preserve the quality and identity of wines. This study confirms the adaptation of native strains to the climatic conditions of each area of production with good fermentation abilities. So the selection of yeast strains adapted to fermentation stress is a tool for making quality wines in very warm areas. More studies are necessary to understand the mechanisms of yeast adaption to ambient changes and their influences in wine composition.

### Acknowledgements

This work was supported by project RM2010-00009-C03-01 funded by INIA. Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and was developed in part by a fellowship of the OECD Co-operative Research Programme (CRP) in the Bioenergy & Brewing Science, School of Biosciences, Sutton Bonington Campus, University of Nottingham. We want to thank to The Wine Standards Board for the Wines of Madrid Appellation of Origin and the wineries that kindly participated in this study.

### Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

### References

- Alexandre, H. (2013) Flor yeast of *Saccharomyces cerevisiae*. Their ecology, genetics and metabolism. *Int J Food Microbiol* **167**, 269–275.
- Arroyo, T., Lozano, J., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M., Santos, J.P. and Horrillos, M.C. (2009) Evaluation of wine aromatic compounds by a sensory human panel and an electronic nose. *J Agric Food Chem* **57**, 11543–11549.
- Arroyo, T., Cordero, G., Serrano, A. and Valero, E. (2010)  $\beta$ -Glucosidase production by non-*Saccharomyces* yeasts isolated from vineyard. In *Expression of Multidisciplinary Flavour Science* ed. Blank, I., Wüst, M. and Yeretizian, C. pp. 359–362. Wädenswil, Switzerland: Institut für Chemie und Biologische Chemie (ICBC).
- Attfield, P.V. (1987) Threulose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett* **225**, 259–263.
- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J.M. and Aznar, M. (2013) Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines. *Food Res Int* **53**, 252–259.
- Battagliani, A., Barbeau, G., Bindi, M. and Badeck, F.W. (2009) European winegrowers perceptions of climate change impact and options for adaptation. *Reg Environ Change* **9**, 61–73.
- Bauer, F.F. and Pretorius, I.S. (2000) Yeast stresses response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. A review. *S Afr J Enol Vitic* **21**, 27–51.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E. and Querol, A. (2008) Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int J Food Microbiol* **122**, 188–195.
- Bely, M., Rinaldi, A. and Dobourdiou, D. (2003) Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J Biosci Bioeng* **96**, 507–512.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. and Dubordieu, D. (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* **122**, 312–320.
- Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palmero, D. and Suárez-Lepe, J.A. (2014) Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiol* **42**, 218–224.
- Bernetti, I., Menghini, S., Marinelli, N., Sacchelli, S. and Alampi, V. (2012) Assessment of climate change impact on viticulture: economic evaluations and adaptation strategies analysis for the Tuscan wine sector. *Wine Econ Policy* **1**, 73–86.
- Berridge, M.V., Ptries, M.H. and Tan, A.S. (2005) Tetrazolium dyes as tool in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* **11**, 1387–2656.
- Borglin, S., Joyner, D., DeAngelis, K., Khudyakov, J., D'haeseleer, P., Joachimiak, M. and Hazen, T. (2012)



- Application of phenotypic microarrays to environmental microbiology. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 41–48.
- Calderone, G., Naulet, N., Guillon, C. and Reniero, F. (2004) Characterization of European wine glycerol: stable carbon isotope. *J Agric Food Chem* **52**, 5902–5906.
- Caridi, A., Cruccitti, P. and Ramondino, D. (1999) Winemaking of musts at high osmotic strength by thermotolerant yeasts. *Biotechnol Lett* **21**, 617–620.
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E. and Henschke, P.A. (2008) Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strain. *FEMS Yeast Res* **8**, 1196–1207.
- Castro, M.J., Martín-Vide, D. and Alonso, S. (2005) El clima de España: pasado, presente y escenarios de clima para el siglo XXI. In *En Evaluación Preliminar de los Impactos en España por Efecto del Cambio Climático* ed. Moreno, J.M. pp. 1–64. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A., Curtin, C. and Varela, C. (2015) The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int J Food Microbiol* **205**, 7–15.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D. and Valero, E. (2011a) Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int J Food Microbiol* **145**, 132–139.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. and Valero, E. (2011b) Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *Int J Food Microbiol* **148**, 23–26.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M. and Arroyo, T. (2013) Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv L). *Eur Food Res Technol* **236**, 193–207.
- Coulter, A.D., Henschke, P.A., Simos, C.A. and Pretorius, I.S. (2008) When the heat is on, yeast fermentation runs out of puff. *Austr N Z Wine Ind J* **23**, 26–30.
- DeNittis, M., Querol, A., Zannoni, B., Minati, J.L. and Ambrosoli, R. (2010) Possible use of Biolog methodology for monitoring yeast presence in alcoholic fermentation for wine-making. *J App Microbiol* **108**, 1199–1206.
- Dequin, S. and Casaregola, S. (2011) The genome of fermentative *Saccharomyces*. *C R Biol* **334**, 687–693.
- Duarte, A. and O'Neill, M. (2011) Climate changes from the perspective of Spanish wine growers: a three-region study. *Br Food J* **113**, 205–221.
- Erasmus, D.J., Cliff, A. and van Vuuren, H.J.J. (2004) Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *Am J Enol Vitic* **55**, 71–78.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999) Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8 rRNA and the two ribosomal internal transcribed spacers (ITS) region. *Arch Microbiol* **169**, 387–392.
- E-Viticulture (2012) *Lifelong Learning Project, E-Viticulture*. EuroProject Lifelong Learning Programme. Available at: <http://www.eviticlimate.eu>
- Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. and Barrio, E. (2000) RFLP analysis of the ribosomal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: fast method species identification and the differentiation of flour yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* **78**, 87–97.
- Fleet, G.H. (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res* **8**, 979–995.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) Yeasts: growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G.H. pp. 27–55. Philadelphia, PA: Harwood.
- García-Martínez, T., López de Lerma, N., Moreno, J., Peinado, R., Millán, C. and Mauricio, C. (2013) Sweet wine production by two osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Food Sci* **78**, 874–879.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M. and Brow, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241–4257.
- Gibson, B., Lawrence, S., Leclaire, J., Powell, C. and Smart, K. (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 535–569.
- Gil, M., Cabellos, J.M., Arroyo, T. and Prodanov, M. (2006) Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin 'Vinos de Madrid' (Spain). *Anal Chim Acta* **563**, 145–153.
- Greetham, D., Wimalasena, T.T., Kerruish, D.W.M., Brindley, S., Ibbet, R.N., Linforth, R.L., Tucher, G., Phister, T.G. *et al.* (2014) Development of a phenotypic assay for characterization of ethanologenic yeast strain sensitivity to inhibitors released from lignocellulosic feedstocks. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**, 931–945.
- Grieco, F., Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Panico, E., Grieco, F., Mita, G. and Logreico, A. (2011) Exploitation of autochthonous micro-organism potential to enhance the quality of Apulian wines. *Ann Microbiol* **61**, 67–73.
- Hirasawa, T., Ashitani, K., Yoshikawa, K., Nagasaka, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H. and Shioya, S. (2006) Comparison of transcriptional response to osmotic stresses induced by NaCl and sorbitol additions in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *J Biosci Bioeng* **6**, 568–571.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmo-adaptation in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300–372.
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E. and del Olmo, M. (1990) An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeast. A molecular study. *Biotech Bioeng* **64**, 688–708.



- Jones, G.V. (2007) Climate change: observations, projections, and general implications for viticulture and wine production. In *Whitman College Economics Department Working Paper*. pp. 1–7. Walla Walla, WA: Whitman College.
- Keller, M.M. (2010) Managing grapevines to optimize fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturist. *Aust J Grape Wine Res* **16**, 56–59.
- Lereboullet, A.L., Beltrando, G. and Bardsley, D.K. (2012) Socio-ecological adaptation to climate change: a comparative case study from the Mediterranean wine industry in France and Australia. *Agric Ecosyst Environ* **164**, 273–285.
- Loira, I., Vejerano, R., Morata, A., Tesfaye, W., González, C. and Suárez-Lepe, J.A. (2011) Control del grado alcohólico en zonas cálidas mediante el empleo de levaduras seleccionadas con influencia glicolítica y bloqueadores metabólicos. In *XI Congreso Nacional de Investigación Enológica*, Jérez, pp. 48–49.
- López de Lerma, N. and Peinado, R.A. (2011) Use of two osmoethanol tolerant yeast strain to ferment must from Tempranillo dried grapes. Effect on wine composition. *Int J Food Microbiol* **135**, 447–452.
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., González, R., Mas, A. and Beltrán, G. (2012) Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Res* **12**, 477–482.
- Mira de Orduña, R. (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res Int* **43**, 1844–1855.
- Moreno Rodríguez, J.M. (2005) *Evaluación Preliminar de los Impactos en España por Efecto del Cambio Climático*. Madrid: Secretaría General Técnica. Ministerio de Medio Ambiente.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Oulompasi, E. and Tzanetakis, N. (2006) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiol* **23**, 205–211.
- Nisiotou, A. and Nychas, G.J.E. (2007) Yeast populations residing on healthy or Botrytis infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2765–2768.
- Pallioti, A., Tombesi, S., Silvestroni, O., Lanari, V., Gatti, M. and Poni, S. (2014) Changes in vineyard establishment and canopy management urged by earlier climate-related grape ripening: a review. *Sci Hort* **178**, 43–54.
- Pérez-Ortín, J., García-Márquez, J. and Alberola, M. (2002) DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J Biotechnol* **98**, 227–241.
- Powell, D.C., Quain, D.E. and Smart, K.A. (2008) The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res* **3**, 149–157.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 657–729.
- Ramírez, M., Vinagre, A., Ambrona, J., Molina, F., Maqueda, M. and Rebollo, J.E. (2004) Genetic instability of heterozygous hybrid populations of natural wine yeasts. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4686–4691.
- Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L. and Dequin, S. (2003) Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to GpdIp and is only partially controlled by HOG pathway. *Yeast* **20**, 1243–1253.
- Renée, M. and Mozell, L.T. (2014) The impact of climate change on the global wine industry: challenges and solutions. *Wine Econ Policy* **3**, 81–89.
- Robinson, A.L., Ebeler, S.E., Heymann, H., Boss, P.K., Solomon, P.S. and Trengove, R.D. (2009) Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *J Agric Food Chem* **57**, 10313–10322.
- Salvadó, Z., Chiva, R., Rodríguez-Vargas, S., Ránde-Gil, F., Mas, A. and Guillamon, J.M. (2008) Proteomic evolution of wine yeast during the first hours of fermentation. *FEMS Yeast Res* **8**, 1137–1146.
- Serra, A., Strehaiano, P. and Taillander, P. (2005) Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *bayanus* growth: impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *Int J Food Microbiol* **104**, 257–265.
- Sigler, J. (2008) In den Zeiten des Klimawandels: Von der Süßreserve zur Sauerreserve? *Der Badische Winzer* **33**, 21–25.
- Stock, M., Gerstengarbe, F.W., Kartschall, T. and Werner, P.C. (2005) Reliability of climate change impact assessment for viticulture. VII International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology (ISHS). *Acta Hort* **689**, 29–40.
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J.M. and Arroyo, T. (2012) Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J Appl Microbiol* **112**, 302–315.
- Thaillandier, P., Ramon-Portugal, F., Fuster, A. and Strehaiano, P. (2007) Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiol* **24**, 95–100.
- Tofalo, R., Chaves-Lopez, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G.E., Torriani, S., Paparella, A. and Suzzi, G. (2009) Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *Int J Food Microbiol* **130**, 179–187.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., Mita, G., Spano, G. et al. (2012) Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *J Microbiol Biotechnol* **39**, 81–92.
- Vararu, F., Moreno-García, J., Zarnfir, C.I., Valerin, V.C. and Moreno, J. (2016) Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting must with starter cultures of commercial yeast strains. *Food Chem* **197**, 373–381.

- Vaudano, E. and García-Moruno, E. (2008) Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiol* **25**, 56–64.
- Vink, N., Deloire, A., Bonnardot, V. and Ewert, J. (2009) Terroir, climate change and the future of South Africa's wine industry. Australian Agricultural and Resource Economics Society. Retrieved from: [http://www.adelaide.edu.au/wine-econ/events/2030workshop/pubs/Vink\\_WCO210.pdf](http://www.adelaide.edu.au/wine-econ/events/2030workshop/pubs/Vink_WCO210.pdf).
- Wimalasena, T.T., Greetham, D., Marvin, M.E., Liti, G., Chandelia, Y., Hart, A.J., Louis, E.J., Phister, T.G. *et al.* (2014) Phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. *Microb Cell Fact* **13**, 47.
- Zuzuarregui, A. and del Olmo, M. (2004) Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. *FEMS Yeast Res* **4**, 699–710.
- Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C. and del Olmo, M. (2006) Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *App Environ Microbiol* **72**, 836–847.



**3.3. Use of native non-*Saccharomyces* strain: A new strategy in D.O. “Vinos de Madrid” (Spain) wines elaboration**

García, M., Arroyo, T., Crespo, J., Cabellos, J. M. y Esteve-Zarzoso, B.

Publicado en:

European Journal of Food Science and Technology, 2017, 5(2), pp. 1–31.

## Uso de una cepa de no-*Saccharomyces* nativa: Una nueva estrategia en la elaboración de vinos en la D.O. “Vinos de Madrid”

### RESUMEN

El empleo de levaduras nativas puede ser considerado una buena estrategia para aumentar la identidad regional de los vinos, y el uso controlado de fermentaciones iniciadoras múltiples para mejorar las características específicas y especiales del vino puede ser una estrategia interesante. En este trabajo, el uso de levaduras nativas de cepas no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* de la D.O. “Vinos de Madrid” en fermentaciones con uvas Malvar, una variedad blanca autóctona de Madrid, ha sido empleado para seleccionar nuevos procesos biotecnológicos que influyen en la elaboración de vino. Se ha estudiado *Torulaspora delbrueckii* CLI 918, *Schizosaccharomyces pombe* CLI 1085, *Candida stellata* CLI 920, *Metschnikowia pulcherrima* CLI 457 y *Lachancea thermotolerans* 9-6C en cultivo puro o en combinación mixta o secuencial con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889. En general, la inoculación secuencial ha destacado por su contribución en la mayor complejidad y calidad de los vinos producidos. Los resultados tienen especial relevancia porque la utilización de estas levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vinos puede ser empleada para promover diferentes propiedades enológicas, aromáticas y sensoriales en los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid” de acuerdo con las necesidades de los elaboradores de vino.

**Contribución personal al manuscrito:** Yo he participado en el diseño de los experimentos, en la realización de los experimentos, en el análisis de los resultados y su discusión y en elaboración del manuscrito.

## USE OF NATIVE NON-SACCHAROMYCES STRAIN: A NEW STRATEGY IN D.O. "VINOS DE MADRID" (SPAIN) WINES ELABORATION

Margarita García<sup>1</sup>, Teresa Arroyo<sup>1,\*</sup>, Julia Crespo<sup>1</sup>, Juan Mariano Cabellos<sup>1</sup> and Braulio Esteve-Zarzoso<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Agroalimentación, IMIDRA, Ctra. A2 km 38.200, Alcalá de Henares 28800, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel··i Domingo 1, Tarragona 43007, Spain.

**ABSTRACT:** *The use of native yeasts can be considered a good strategy for enhanced regional identity of wines, and the use of controlled multistarter fermentations to improve special and specific characteristics of wine may be an interesting approach. In this work, the application of native non-Saccharomyces and Saccharomyces strains from D.O. "Vinos de Madrid" in fermentations with Malvar grapes, an autochthonous white variety from Madrid, has been used to select new biotechnological processes which perform wine elaboration. Torulaspora delbrueckii CLI 918, Schizosaccharomyces pombe CLI 1085, Candida stellata CLI 920, Metschnikowia pulcherrima CLI 457, Lachancea thermotolerans 9-6C in pure cultures or mixed and in sequential combination with the Saccharomyces cerevisiae CLI 889 strain have been studied. In general, sequential inoculation has been highlighted by its contribution to higher complexity and quality in the wines produced. The results have special relevance because the implementation of these non-Saccharomyces in winemaking can be used to promote different oenological, aromatic and sensorial properties in wines from D.O. "Vinos de Madrid" according to the requirements of winemakers.*

**KEYWORDS:** Native Yeast; Multistarter Fermentation; Malvar Wine; Aroma; Sensorial Analysis

## INTRODUCTION

Grape juice fermentation into wine involves a sequential succession of yeasts. Initially, species of non-Saccharomyces genera as Hanseniaspora (Kloeckera), Rhodotorula, Issatchenkia, Debaryomyces, Zygosaccharomyces, Pichia, Torulaspora, Schizosaccharomyces, Candida, Metschnikowia and Cryptococcus are found at low levels in fresh must (Kunkee and Bisson, 1991). Traditionally, the use of non-Saccharomyces in the wine elaboration has not been usual due to preceding investigations which showed that several species produce high levels of undesirable compounds that affect wine quality such as acetoin, ethyl acetate, acetic acid and acetaldehyde (Van Kerken, 1963; Cominiti *et al.*, 2011). Unfortunately, this exclusion of non-Saccharomyces yeasts from the fermentation process may result in a loss of complexity and wines lacking in particular characteristics.

In recent years, a re-evaluation of the role of non-Saccharomyces yeasts in winemaking (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998) has resulted in several studies that have looked at the use of controlled mixed fermentations as a biotechnological tool in order to improve wine

complexity (Clemente-Jimenez *et al.*, 2005; Sadoudi *et al.*, 2012). The use of controlled fermentations of non-*Saccharomyces* yeasts together with *S. cerevisiae* can be suggested as a useful tool for wine production, which allows for the reproduction of microbiological and technical aspects that occur in spontaneous fermentation, as well as an increase in the wine aroma complexity owing to a more complex synthesis of aromatic compounds (Sun *et al.*, 2014). This practice has also been reported as being able to increase some desirable metabolites, such as some acetate esters (Rojas *et al.*, 2003) and glycerol (Contreras *et al.*, 2014). Moreover, some non-*Saccharomyces* yeasts have been reported as being able to release more polysaccharides than *S. cerevisiae* strains (Giovani *et al.*, 2012).

The application of non-*Saccharomyces* yeasts in wine elaboration has changed the standardized way to produce wine, improving the quality of the final product. On the other hand, the use of native yeasts is being favoured. These native *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains are isolated from different winegrowing regions with typical attributes that could be representative of a certain region (Tello *et al.*, 2012) and are better adapted to specific environmental conditions and substrates (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000).

The Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (with a total extension of 8,390 ha) is located in the centre of Spain and is relatively new, created in 1990. Winemakers of this region base their production on the cultivation of the wine varieties Airén, Malvar, Garnacha and Tempranillo (*Vitis vinifera* L. cv.) to elaborate new styles of wine more competitive in the market (Gil *et al.*, 2006).

The aim of this work was the oenological characterization of five non-*Saccharomyces* autochthonous yeast species under several co-culture conditions in combination with selected yeast of *S. cerevisiae* to improve the organoleptic properties of the regional Malvar wines.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast strains

The non-*Saccharomyces* strains used in this study were selected based on their biotechnological potential (Arroyo *et al.*, 2010; Cordero-Bueso *et al.*, 2013). *T. delbrueckii* CLI 918, *S. pombe* CLI 1085, *C. stellata* CLI 920, *M. pulcherrima* CLI 457 belong to the yeast collection of IMIDRA Institute and *L. thermotolerans* 9-6C was isolated from spontaneous fermentations of the autochthonous grape variety Malvar (Cordero-Bueso *et al.*, 2011). *S. cerevisiae* CLI 889 strain was selected and characterized in our laboratories based on some established and desirable oenological criteria (Arroyo, 2000; Cordero-Bueso *et al.*, 2016). All yeast strains used were previously isolated on the Madrid winegrowing region.

Cryogenically preserved strains (-80 °C) were cultured and maintained on YPD plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 20% agar (Conda Laboratories, Madrid, Spain), w/v) and stored at 4 °C. Lysine agar (0.25% L-Lysine monohydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1.17% yeast carbon base (Difco, Detroit, MI, USA) and 2% agar, w/v) was the medium used in screening as an initial rough discrimination between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains (Fowell, 1965).



### Must preparation

Fresh Malvar grape (*Vitis vinifera* L. cv.) must (vintage 2010), clarified by pectolytic enzymes (Enozym Altair, Agrovin, Spain) (1 g/hL) at 4 °C, was stored at -20 °C until needed. The must was initially adjusted to establish values of pH 3.4, the concentration of sugars was 21.5 °B and total acidity (expressed as g L<sup>-1</sup> of tartaric acid) was 4.28 g L<sup>-1</sup>. Musts were supplemented with nitrogen by adding ammonium sulphate up to a level of 250 mgN L<sup>-1</sup> to avoid slow, sluggish or stuck fermentations because of inadequate amounts of assimilable nitrogen (Bisson, 1999). Yeast assimilable nitrogen (YAN) was determined in must by the formol titration method (Gump *et al.*, 2002).

At the time of use, the must was thawed and pasteurized to fluent vapour in an autoclave at 80 °C, 15 min, three times on three consecutive days to avoid caramelization of the sugars. The effectiveness of this treatment was verified by YPD plating.

### Laboratory-scale fermentations

Triplicate experiments were carried out in sterile flasks with 1 L of pasteurized Malvar must with constant agitation (150 rpm) in an 18 °C temperature controlled room. The flasks were plugged with a Müller valve filled with 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Panreac) to allow the release of CO<sub>2</sub> while preserving the sterile conditions (Vaughnan-Martini and Martini, 1999). Inoculum was performed by growing of yeasts in a YPD liquid medium at 28 °C for 48 h.

The trials were carried out with must of the Malvar variety in two different stages. First, the non-*Saccharomyces* strains, *T. delbrueckii*, *S. pombe* and *C. stellata* were tested against the control *S. cerevisiae* CLI 889 (p-Sc1). In a second step, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* were assayed with the same strain as control (p-Sc2).

The trials were divided into pure, mixed and sequential cultures. Pure cultures were inoculated with 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of each yeast strain. Mixed fermentation trials were simultaneously inoculated with the same amount (10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>) of non-*Saccharomyces* cultures and *S. cerevisiae* strain. Sequential fermentation trials were inoculated with 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of the non-*Saccharomyces* cultures at first and the addition of the *S. cerevisiae* strain (10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>) took place when the wine contained about 5 % alcohol (v/v), estimated according to the weight loss as CO<sub>2</sub> released (g L<sup>-1</sup>) (Jackson, 2008).

The fermentation progress was monitored by automatic weight using the software OPCEX3 (Resolvica, Inc.) every 24 h until a constant weight was reached. After fermentation, the wines were stored at 4 °C to encourage yeast settling before the analysis.

### Microbial and analytical determinations of vinification

Samples were collected daily over the fermentation and diluted appropriately before plating. Non-*Saccharomyces* cells were counted using lysine agar. Total yeast cells were counted in YPD plates. The number of *S. cerevisiae* was given as the difference between the total plate count using YPD and the plate count using lysine agar.

Oenological parameters measured were: alcohol degree, pH, volatile acidity, total acidity, reducing sugars, glycerol, malic acid and lactic acid. They were measured by Fourier transform infrared spectroscopy in the laboratories of Liec Agroalimentaria S.L.

Published by European Centre for Research Training and Development UK ([www.eajournals.org](http://www.eajournals.org)) (Manzanares, Spain), an accredited laboratory for physico-chemical analysis in wines to conform to UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 rules.

Quantification of major volatile compounds was carried out in a GC Agilent 6850 with a FID detector equipped with a column DB-Wax (60 m x 0.32 mm x 0.5 µm film thickness) from J&W Scientific (Folsom, CA, USA). The volatile compounds were analysed according to Gil *et al.* (2006) and Balboa-Lagunero *et al.* (2013).

### Sensory analysis

The final wines were tested by a trained panel of seven expert judges (four women and three men) from the IMIDRA Institute. This panel had been previously trained in the laboratory in the recognition of wine aromas. Wines from pure, mixed and sequential cultures were compared by triangle tests (ISO 4120:2007) to assess whether aroma differences existed between the different types of cultures. Sensory descriptive analysis was used to describe and quantify attributes of the wines on the basis of a scale from 1 (low intensity) to 10 (high intensity). The final score was obtained as the mean of the wine evaluations with their respective standard deviation (Arroyo *et al.*, 2009; Balboa-Lagunero *et al.*, 2013).

### Statistical treatment

Analysis of variance (ANOVA) was applied on oenological parameters and volatile compounds in pure, mixed and sequential cultures. Tukey HSD post-hoc tests were applied to establish the significance of differences between means ( $\alpha = 0.05$ ). In order to identify the most influential volatile compounds in the differentiation between the different types of cultures, the 32 studied volatile compounds were submitted to discriminant function analysis (DFA). The data were analysed with SPSS Statistics 21.0 Software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTS

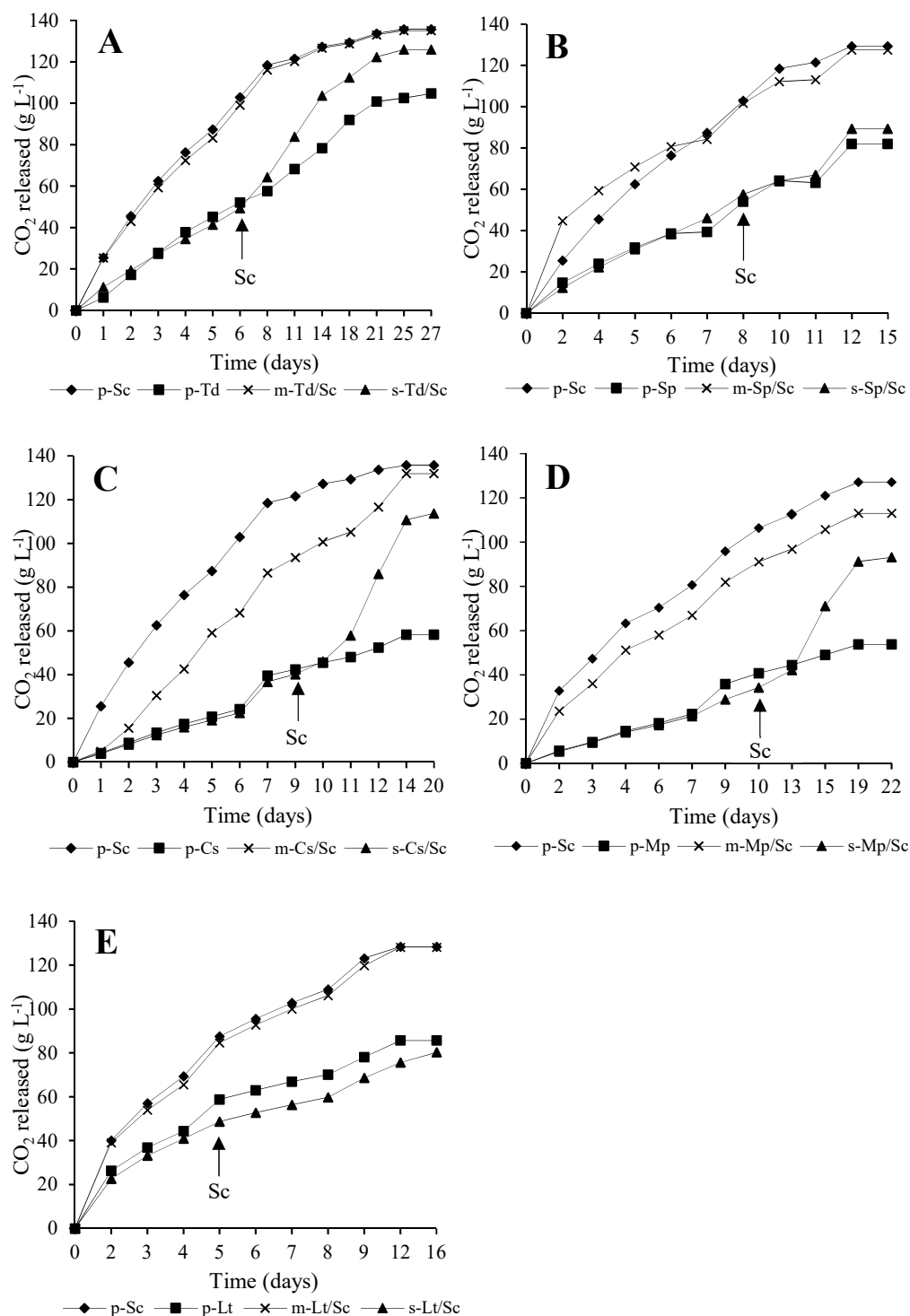
In the following sections, the main results of the wine fermentations conducted using *S. cerevisiae* strain CLI 889 and each non-*Saccharomyces* yeasts mentioned above are summarised. To improve the results, one control of *S. cerevisiae* was performed for each lot of must used. In relation to volatile composition, the contribution of each compound to the entire aroma of wines can be estimated by its odour activity value (OAV). Even this value does not take into account the depressive or synergic odour interactions between the different molecules present in wines, OAV can be considered as a first approximation to the potential contribution of each compound to the overall aroma (Ferreira *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2002). OAVs of 32 volatile compounds were calculated (see Supplementary Material).

### Trials with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889

Fermentation kinetics of trials of the *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* strains are shown in Figure 1A. Mixed culture (m-Td/Sc) presented a similar fermentation rate in comparison with pure culture of *S. cerevisiae* (p-Sc1, considered as control). When *S. cerevisiae* inoculum (Sc in graphics) was added in sequential inoculation (s-Td/Sc), the CO<sub>2</sub> released was increased considerably. These co-cultures with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* were characterized by an amount of residual sugar lower to 3 g L<sup>-1</sup> (Table 1), which were therefore considered as dry wines. However, pure culture of *T. delbrueckii* (p-Td) did not

Published by European Centre for Research Training and Development UK (www.eajournals.org)

**Figure 1. Fermentation kinetics of pure (p), mixed (m) and sequential (s) cultures in Malvar must at 18 °C.** A) Cultures with *T. delbrueckii* (Td) and *S. cerevisiae* (Sc). B) Cultures with *S. pombe* (Sp) and *S. cerevisiae* (Sc). C) Cultures with *C. stellata* (Cs) and *S. cerevisiae* (Sc). D) Cultures with *M. pulcherrima* (Mp) and *S. cerevisiae* (Sc). E) Cultures with *L. thermotolerans* (Lt) and *S. cerevisiae* (Sc). Values are the means from triplicate fermentations.



consume the total quantity of sugars ending with 33.70 g L<sup>-1</sup> and induced a slight increase of volatile acidity (0.60 g L<sup>-1</sup>). This lower fermentative capacity of *T. delbrueckii* pure culture can also be observed in the smaller CO<sub>2</sub> released (Figure 1A). By contrast, the volatile acidity of co-cultures was not significantly different from the control; it was even lower in mixed culture (Table 1). Glycerol concentrations in wines fermented with pure *S. cerevisiae* culture and mixed culture of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* did not differ significantly. On the contrary, pure *T. delbrueckii* and sequential fermentations produced more glycerol (7.14 and 5.28 g L<sup>-1</sup>, respectively). Also, it should be noted the ethanol lowering in sequential culture of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* (Table 1).

Fermentations with the presence of both yeasts species showed an increase of  $\beta$ -phenylethyl alcohol respect to the control, the higher production was notable in the sequential culture (Table 2). Pure culture of this non-*Saccharomyces* strain was clearly defined by its higher concentration of 1-hexanol and ethyl isobutyrate. However, ethyl isobutyrate was only detected on pure fermentation of *T. delbrueckii*. The sequential elaboration with *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* produced larger contents of 2-phenylethyl acetate and ethyl hexanoate (Table 2). Regarding acid composition of the final products, it is possible to observe a reduction on the compounds analyzed when *T. delbrueckii* was inoculated in a sequential way (Table 2).

The significant differences identified in the aroma composition of pure and sequential cultures of *T. delbrueckii* with respect to the control (p-Sc1), were also present in the sensorial analysis (Figure 2A). All tasters were able to distinguish the wines from pure and sequential cultures of *T. delbrueckii* from the control wine by triangle tests (data not shown). Thus, this result indicates the existence of sensory differences between these wines, higher than those observed in the analytical profile. All panellists expressed their preference for the sequential culture. They valued pure and sequential cultures of *T. delbrueckii* as the best ones due to their fruity and flowery aroma, higher aroma intensity and overall quality. The fruity and flowery aroma in these wines is related to a larger concentration in some volatile compounds such as  $\beta$ -phenylethyl alcohol, ethyl isovalerate, ethyl hexanoate, 2-phenylethyl acetate in sequential culture and ethyl isobutyrate in pure culture (Table 2); OAVs of these compounds were higher than 1 therefore they should be considered to have active contribution on the global aroma (see Supplementary Material). For mixed culture of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*, tasters differentiated this type of inoculation regarding the control with a 5 % significance level, they highlighted the sensory similarity between control and mixed culture. This appreciation of tasters was corroborated by results included in Table 1 and Table 2, where few significant differences between them were observed.

#### **Trials with *S. pombe* CLI 1085 and *S. cerevisiae* CLI 889**

As expected, the strain *S. pombe* CLI 1085 presented lower fermentative capacity in pure culture (p-Sp) than the control of *S. cerevisiae* (Figure 1B), however this behaviour is also observed in sequential inoculation (s-Sp/Sc). It can be observed that mixed culture of *S. pombe*/*S. cerevisiae* (m-Sp/Sc) was the best combination to consume almost all sugars (Table 1). In pure and sequential cultures with *S. pombe*, it was reached just over 10 % of ethanol content. This strain of *S. pombe* can metabolize the malic acid, this capacity can be seen using pure and sequential cultures, by contrast, 0.95 g L<sup>-1</sup> and 0.81 g L<sup>-1</sup> of malic acid were observed in the control (p-Sc1) and in mixed culture, respectively. It should also be highlighted that the volatile acidity was lower in pure and

**Table 1. Principal oenological parameters at the end of the different inoculations.** Values are means  $\pm$  standard deviations of triplicate fermentations. \* Means statistically different from the respective control,  $p < 0.05$ . <sup>a</sup> Abbreviations related with the type of culture employed and the yeast strains are explained in Figure 2. <sup>b</sup> *S. cerevisiae* pure culture p-Sc1 was taken as the control in *T. delbrueckii* – *S. cerevisiae*, *S. pombe* – *S. cerevisiae*, *C. stellata* – *S. cerevisiae* trials; *S. cerevisiae* pure culture p-Sc2 was taken as control in *M. pulcherrima* – *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* – *S. cerevisiae* trials.

Trial	Type of culture <sup>a</sup>	Ethanol	pH	Volatile acidity	Total acidity	Reducing sugars	Glycerol	Malic acid	Lactic acid
		% v/v		g/L acetic acid					
<i>T. delbrueckii</i> - <i>S. cerevisiae</i>	p-Sc1 <sup>b</sup>	13.13 ± 0.06	3.30 ± 0.00	0.50 ± 0.01	5.60 ± 0.01	<1.50	3.12 ± 0.14	0.95 ± 0.03	<0.50
	p-Td	10.88 ± 0.19*	3.34 ± 0.03	0.60 ± 0.01*	6.75 ± 0.15*	33.70 ± 2.98*	7.14 ± 0.21*	1.05 ± 0.01	<0.50
	m-Td/Sc	13.03 ± 0.06	3.30 ± 0.01	0.46 ± 0.06	5.46 ± 0.06	<1.50	2.87 ± 0.05	0.90 ± 0.01	<0.50
	s-Td/Sc	12.80 ± 0.00*	3.30 ± 0.00	0.51 ± 0.01	6.06 ± 0.06*	1.70 ± 0.05	5.28 ± 0.20*	0.93 ± 0.06	<0.50
<i>S. pombe</i> - <i>S. cerevisiae</i>	p-Sc1	13.13 ± 0.06	3.30 ± 0.00	0.50 ± 0.01	5.60 ± 0.01	<1.50	3.12 ± 0.14	0.95 ± 0.03	<0.50
	p-Sp	10.21 ± 0.74*	2.98 ± 0.01*	0.33 ± 0.05*	7.08 ± 0.12*	52.93 ± 4.20*	4.45 ± 0.13	<0.20*	0.64 ± 0.07*
	m-Sp/Sc	13.70 ± 0.10	3.20 ± 0.00*	0.73 ± 0.05*	6.56 ± 0.05*	2.43 ± 0.66	5.45 ± 0.17*	0.81 ± 0.03	<0.50
	s-Sp/Sc	10.88 ± 0.94*	3.01 ± 0.01*	0.38 ± 0.05	6.95 ± 0.02*	42.35 ± 6.48*	5.22 ± 0.35*	<0.20*	0.57 ± 0.08*
<i>C. stellata</i> - <i>S. cerevisiae</i>	p-Sc1	13.13 ± 0.06	3.30 ± 0.00	0.50 ± 0.01	5.60 ± 0.01	<1.50	3.12 ± 0.14	0.95 ± 0.03	<0.50
	p-Cs	3.40 ± 0.05*	3.71 ± 0.02*	0.63 ± 0.01*	4.79 ± 0.01*	174.18 ± 0.71*	9.17 ± 0.25*	<0.20*	0.91 ± 0.04*
	m-Cs/Sc	13.70 ± 0.41*	3.37 ± 0.03*	0.70 ± 0.01*	4.93 ± 0.06*	9.66 ± 0.70	5.72 ± 0.12*	0.87 ± 0.09	<0.50
	s-Cs/Sc	13.23 ± 0.23	3.27 ± 0.02	0.55 ± 0.07	4.85 ± 0.06*	25.21 ± 5.19*	6.91 ± 0.68*	0.71 ± 0.15	0.59 ± 0.02*
<i>M. pulcherrima</i> - <i>S. cerevisiae</i>	p-Sc2 <sup>b</sup>	12.90 ± 0.04	3.10 ± 0.00	0.63 ± 0.00	6.43 ± 0.00	<1.50	5.15 ± 0.07	0.91 ± 0.01	<0.50
	p-Mp	4.12 ± 0.71*	3.44 ± 0.02*	0.27 ± 0.02*	5.24 ± 0.22*	152.93 ± 13.85*	9.66 ± 0.29*	<0.20*	1.08 ± 0.10*
	m-Mp/Sc	11.31 ± 0.77	3.10 ± 0.02	0.83 ± 0.00*	6.23 ± 0.04	45.19 ± 12.04*	6.02 ± 0.19	0.94 ± 0.06	0.73 ± 0.09*
	s-Mp/Sc	10.66 ± 2.21	3.12 ± 0.01	0.51 ± 0.03*	5.98 ± 0.53	56.50 ± 2.36*	7.40 ± 0.52*	0.85 ± 0.20	0.74 ± 0.15*
<i>L. thermotolerans</i> - <i>S. cerevisiae</i>	p-Sc2	12.90 ± 0.04	3.10 ± 0.00	0.63 ± 0.00	6.43 ± 0.00	<1.50	5.15 ± 0.07	0.91 ± 0.01	<0.50
	p-Lt	7.19 ± 0.26*	2.43 ± 0.07*	0.78 ± 0.01*	16.24 ± 0.77*	77.15 ± 4.75*	0.93 ± 0.14*	<0.20*	8.32 ± 0.62*
	m-Lt/Sc	12.63 ± 0.05	3.10 ± 0.00	0.46 ± 0.05	6.46 ± 0.11	<1.50	4.75 ± 0.07*	0.61 ± 0.02*	0.56 ± 0.04
	s-Lt/Sc	7.29 ± 0.13*	2.47 ± 0.02*	0.77 ± 0.01*	15.80 ± 0.33*	73.05 ± 2.37*	0.92 ± 0.19*	<0.20*	7.99 ± 0.29*

sequential inoculations with this non-*Saccharomyces* strain (0.33 and 0.38 g L<sup>-1</sup> respectively), but the fermentation was not finished in both cases.

Significant differences in aroma composition were higher between pure and sequential cultures of *S. pombe* and the control (Table 2). The concentration of volatile compounds related with flowery descriptors as  $\beta$ -phenylethyl alcohol and 2-phenylethyl acetate was higher in cultures elaborated with *S. pombe* strain. In addition, undesirable acid compounds as hexanoic, octanoic and decanoic acids associated with butter and cheese aromas were also elevated in cultures inoculated with *S. pombe*. By contrast, mixed and sequential fermentations showed a reduction on the content of acetoine, also related to butter aroma. In general, the tasters noted that the cultures made with *S. pombe* CLI 1085 strain did not improve the organoleptic properties of Malvar wines (Figure 2B) in comparison with Malvar wines elaborated with an autochthonous *S. cerevisiae* strain. They showed a slight preference for sequential culture indicating their higher fruity aroma, however this fermentation showed a high sugars content (more than 40 g L<sup>-1</sup>). On the other hand, the panellists were able to differentiate between all types of inoculation in this trial with a 0.1 % significance level by triangle tests.

#### **Trials with *C. stellata* CLI 920 and *S. cerevisiae* CLI 889**

Figure 1C shows the fermentation kinetic of *C. stellata* and *S. cerevisiae* cultures, low fermentative capacity of cultures elaborated with *C. stellata* strain can be observed in comparison with the control of *S. cerevisiae* (p-Sc). The addition of *S. cerevisiae* (day 9) produced an important increase in the fermentation rate in sequential fermentation, but still this culture finished with 25.21 g L<sup>-1</sup> of reducing sugars (Table 1). *C. stellata* CLI 920 strain was the least ethanol tolerant yeast species in this study (Table 1), the pure culture of *C. stellata* (p-Cs) produced 3.40 % (v/v) of ethanol and this fermentation finished with 174.18 g L<sup>-1</sup> of reducing sugars. In mixed (m-Cs/Sc) culture of *C. stellata*/*S. cerevisiae*, ethanol production was higher than the control (Table 1). This strain of non-*Saccharomyces* showed a high capacity to produce glycerol; the presence of this yeast species on fermentations produce a significant increase of glycerol on final wine, independently of the sugar left on the final product (Table 1).

Moreover, it is possible to observe a significant difference ( $p < 0.05$ ) of volatile composition in mixed and sequential cultures of *C. stellata*/*S. cerevisiae* to the rest, they are characterized by increased esters concentration such as ethyl hexanoate, ethyl butyrate, ethyl octanoate and isoamyl acetate (Table 2). Medium-chain fatty acids such as hexanoic, octanoic and decanoic acids were higher in mixed and sequential cultures with *C. stellata*.

It was also easy for the tasters differentiate pure and co-cultures elaborated with *C. stellata* CLI 920 strain. In spite of the high sugar content left on final product, the pure inoculation of *C. stellata* was the most appreciated by tasters (Figure 2C) for its pleasant sweet flavour and a high concentration in pleasant volatile compounds such as  $\beta$ -phenylethyl alcohol (roses), isoamyl acetate and ethyl hexanoate that are important contributors to the pleasant fruity note of wine (Gil *et al.*, 1996).



**Table 2. Volatile compounds (mg L<sup>-1</sup>), ODE (odour description) and OTV (odour threshold value, mg L<sup>-1</sup>, Balboa-Lagunero *et al.* 2013) of pure (p), mixed (m) and sequential (s) cultures made with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains. Values are the mean  $\pm$  SD of triplicate fermentations. \*Means statistically different from the respective control,  $p < 0.05$ . Abbreviations related with the type of culture employed and the yeast strains are explained in Figure 2. <sup>a</sup> *S. cerevisiae* pure culture p-Sc1 was taken as the control in *T. delbrueckii* – *S. cerevisiae*, *S. pombe* – *S. cerevisiae*, *C. stellata* – *S. cerevisiae* trials; *S. cerevisiae* pure culture p-Sc2 was taken as control in *M. pulcherrima* – *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* – *S. cerevisiae* trials.**

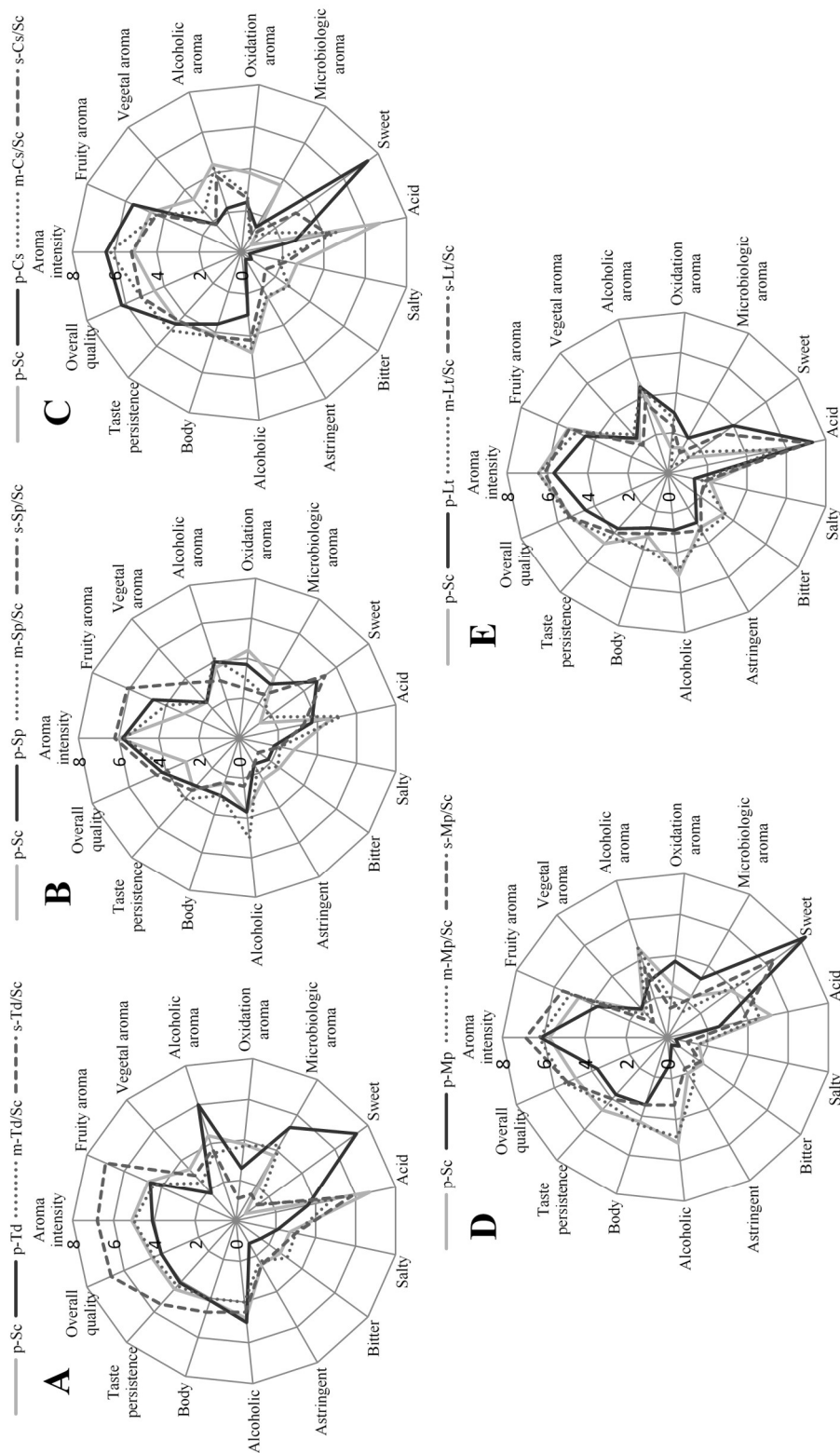
Compound	ODE	OTV	<i>S. cerevisiae</i>			<i>T. delbrueckii</i> – <i>S. cerevisiae</i>			<i>S. pombe</i> – <i>S. cerevisiae</i>		
			p-Sc1 <sup>a</sup>			m-TdSc			p-Sc		
				p-Td			s-Td/Sc			m-Sc/Sc	s-Sc/Sc
1-Propanol	Alcohol, ripe fruit	9	3.14 $\pm$ 0.08	3.46 $\pm$ 0.12	3.71 $\pm$ 0.12	2.00 $\pm$ 0.20	2.72 $\pm$ 0.60	2.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00
1-Butanol	Soap, fatty, diesel	150	0.31 $\pm$ 0.00	0.76 $\pm$ 0.00*	0.44 $\pm$ 0.01*	0.77 $\pm$ 0.01*	0.30 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.03*	0.33 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.02
Isobutanol	Bitter, fusel, alcohol	40	16.58 $\pm$ 3.46	29.40 $\pm$ 2.35	15.66 $\pm$ 0.93	32.96 $\pm$ 1.79*	33.46 $\pm$ 1.03*	13.95 $\pm$ 0.72	25.27 $\pm$ 2.10	13.95 $\pm$ 0.72	25.27 $\pm$ 2.10
Isomyl alcohol	Harsh, bitter	30	89.52 $\pm$ 11.44	140.10 $\pm$ 8.20*	116.38 $\pm$ 9.07*	231.67 $\pm$ 0.84*	69.01 $\pm$ 6.04	106.55 $\pm$ 0.21	70.44 $\pm$ 0.07	106.55 $\pm$ 0.21	70.44 $\pm$ 0.07
(Z)-3-Hexen-1-ol	Lemon, fresh	0.4	0.10 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.03*	0.85 $\pm$ 0.03*	0.18 $\pm$ 0.09*	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01
1-Hexanol	Green grass, fresh	8	0.85 $\pm$ 0.02	2.04 $\pm$ 0.14*	0.85 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.00	0.75 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.06*	0.20 $\pm$ 0.01*	0.57 $\pm$ 0.06*	0.20 $\pm$ 0.01*
Menthol	Garlic	1	0.41 $\pm$ 0.02	1.86 $\pm$ 0.04*	0.57 $\pm$ 0.01	2.03 $\pm$ 0.11*	0.72 $\pm$ 0.10	0.82 $\pm$ 0.10*	0.36 $\pm$ 0.07	0.82 $\pm$ 0.10*	0.36 $\pm$ 0.07
Benzyl alcohol	Pleasant, soft	200	0.09 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.23 $\pm$ 0.08*	0.12 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01
$\beta$ -Phenylethyl alcohol	Flowery, roses	14	10.65 $\pm$ 1.02	28.92 $\pm$ 0.14*	12.77 $\pm$ 0.17	22.96 $\pm$ 1.07*	13.61 $\pm$ 1.83	25.34 $\pm$ 1.02*	9.53 $\pm$ 0.96	25.34 $\pm$ 1.02*	9.53 $\pm$ 0.96
$\Sigma$ Alcohols			121.64 $\pm$ 16.07	206.85 $\pm$ 10.98*	151.05 $\pm$ 10.38*	293.41 $\pm$ 4.11*	120.92 $\pm$ 9.76	149.54 $\pm$ 2.17	108.29 $\pm$ 3.25	149.54 $\pm$ 2.17	108.29 $\pm$ 3.25
Ethyl butyrate	Fruity, sweet, apple	0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.08*	0.20 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.08*
Ethyl isovalerate	Fruity, sweet, banana	0.003	0.24 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.03*	0.22 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.04*	0.22 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.04*	0.22 $\pm$ 0.05
Ethyl isobutyrate	Fruity, pineapple	0.015	0.00 $\pm$ 0.00	2.75 $\pm$ 0.12*	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Isomyl acetate	Banana, sweet, fruity	0.03	0.60 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.09	0.43 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.06*	0.73 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.07*	0.73 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.07*
Ethyl hexanoate	Pineapple, apple	0.014	0.39 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.12	0.58 $\pm$ 0.19	0.21 $\pm$ 0.03*	0.33 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.08
Ethyl-3-hydroxybutyrate	Fruity	20	0.10 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00*	0.15 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00*	0.10 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.02
Hexyl acetate	Fruity, green, pear	1	0.04 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.03*	0.06 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.04*	0.04 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00
2-Phenylethyl acetate	Flowery, lilac	0.25	0.83 $\pm$ 0.11	0.12 $\pm$ 0.01*	0.86 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	1.71 $\pm$ 0.60*	1.25 $\pm$ 0.14	2.12 $\pm$ 0.56*	1.25 $\pm$ 0.14	2.12 $\pm$ 0.56*
Diethyl succinate	Camphor	100	0.31 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.05*	0.34 $\pm$ 0.00	0.47 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01*	0.22 $\pm$ 0.02*	0.25 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.02*
Ethyl octanoate	Fresh, flowery, pineapple	0.58	0.44 $\pm$ 0.10	0.23 $\pm$ 0.09	0.88 $\pm$ 0.07	0.33 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.03
Ethyl lactate	Sour milk	154	3.22 $\pm$ 0.35	0.28 $\pm$ 0.05*	3.80 $\pm$ 0.22	0.24 $\pm$ 0.00*	2.29 $\pm$ 0.09*	1.70 $\pm$ 0.11*	0.65 $\pm$ 0.06*	2.29 $\pm$ 0.09*	0.65 $\pm$ 0.06*
$\Sigma$ Esters			6.31 $\pm$ 0.88	5.32 $\pm$ 0.47	7.15 $\pm$ 0.55	3.40 $\pm$ 0.42*	5.66 $\pm$ 0.93	5.49 $\pm$ 0.78	4.84 $\pm$ 0.97*	5.66 $\pm$ 0.93	4.84 $\pm$ 0.97*
Isobutyric acid	Rancid, butter, cheese	0.05	0.91 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.91 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.00	5.37 $\pm$ 0.85*	0.71 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.11	5.37 $\pm$ 0.85*	0.91 $\pm$ 0.11
Butyric acid	Butter, cheese, stinky	0.173	0.29 $\pm$ 0.09	0.10 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.00	0.60 $\pm$ 0.10*	0.14 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.00*	0.60 $\pm$ 0.10*	0.07 $\pm$ 0.00*
Isovaleric acid	Cheese	0.033	0.54 $\pm$ 0.19	0.01 $\pm$ 0.00*	0.72 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00*	0.24 $\pm$ 0.02*	0.47 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01*	0.24 $\pm$ 0.02*	0.15 $\pm$ 0.01*
Hexanoic acid	Cheese	0.42	2.87 $\pm$ 0.14	1.75 $\pm$ 0.13*	3.13 $\pm$ 0.19	2.29 $\pm$ 0.09	3.00 $\pm$ 0.46	3.21 $\pm$ 0.40	3.79 $\pm$ 0.27*	3.00 $\pm$ 0.46	3.79 $\pm$ 0.27*
Octanoic acid	Sweet, cheesy	0.5	2.11 $\pm$ 0.57	1.15 $\pm$ 0.13	2.22 $\pm$ 0.68	1.11 $\pm$ 0.03	1.14 $\pm$ 0.26*	3.07 $\pm$ 0.50*	3.32 $\pm$ 0.60*	1.14 $\pm$ 0.26*	3.32 $\pm$ 0.60*
Dodecanoic acid	Rancid, fatty	1	0.56 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.10	0.55 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.00*	0.94 $\pm$ 0.10*	0.48 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.00*	0.48 $\pm$ 0.05
$\Sigma$ Acids			7.28 $\pm$ 1.05	3.46 $\pm$ 0.31*	7.90 $\pm$ 1.02	4.66 $\pm$ 0.21*	10.52 $\pm$ 1.06*	8.53 $\pm$ 1.01	8.72 $\pm$ 0.97	10.52 $\pm$ 1.06*	8.72 $\pm$ 0.97
Diacetyl	Butter	0.1	0.00 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.02*	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Furfural	Bread, toasty, candy	15	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00
Benzaldehyde	Sweet, candy, wood	5	0.03 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00
Phenylacetaldehyde	Roses	1	0.00 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00*	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Acetone	Butter	150	1.11 $\pm$ 0.41	1.37 $\pm$ 0.15	0.64 $\pm$ 0.07	2.15 $\pm$ 0.09	59.00 $\pm$ 2.09*	2.03 $\pm$ 0.42	6.81 $\pm$ 1.21*	59.00 $\pm$ 2.09*	6.81 $\pm$ 1.21*
$\Sigma$ Aldehydes/Ketones			1.16 $\pm$ 0.42	1.57 $\pm$ 0.18	0.72 $\pm$ 0.08	2.30 $\pm$ 0.11*	59.06 $\pm$ 2.10*	2.07 $\pm$ 0.42*	6.84 $\pm$ 1.21*	59.06 $\pm$ 2.10*	6.84 $\pm$ 1.21*
$\gamma$ -Butyrolactone	Coconut	35	1.18 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.02	1.05 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.01	1.69 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.08	0.29 $\pm$ 0.03	1.69 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.03



Table 2 (Continued)

C. stellata - S. cerevisiae				S. cerevisiae		M. pulcherrima - S. cerevisiae			L. thermotolerans - S. cerevisiae		
p-Cs	m-Cs/Sc	s-Cs/Sc	p-Se2 <sup>a</sup>	p-Mp	m-Mp/Sc	s-Mp/Sc	p-Lt	m-Lt/Sc	s-Lt/Sc		
3.71 ± 0.40	6.71 ± 0.67*	8.75 ± 1.06*	6.27 ± 0.22	1.69 ± 0.09	2.10 ± 0.02	2.51 ± 0.57	12.18 ± 0.68	13.53 ± 0.76	15.61 ± 0.80*		
0.01 ± 0.00*	0.73 ± 0.13*	0.85 ± 0.20*	0.32 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.50 ± 0.09	0.15 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.26 ± 0.01	0.09 ± 0.02		
101.64 ± 1.02*	26.23 ± 0.90	92.94 ± 0.94*	13.40 ± 3.46	43.33 ± 1.12*	10.47 ± 0.25	40.24 ± 0.98*	49.02 ± 0.86*	16.05 ± 0.14	54.90 ± 0.76*		
52.52 ± 1.04*	130.41 ± 1.57*	166.18 ± 0.85*	103.90 ± 4.30	27.26 ± 0.87*	60.48 ± 1.02	81.40 ± 1.12	167.97 ± 0.75*	125.95 ± 0.99	187.05 ± 0.98*		
0.13 ± 0.00	0.18 ± 0.09*	0.11 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01*	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01*		
0.63 ± 0.02*	0.85 ± 0.02	0.38 ± 0.03*	0.23 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.98 ± 0.20*	0.45 ± 0.07	0.22 ± 0.09		
0.63 ± 0.06	0.70 ± 0.12	0.51 ± 0.11	0.20 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.52 ± 0.06*		
0.04 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.52 ± 0.10*	0.25 ± 0.06*	0.18 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02		
22.86 ± 1.30*	14.20 ± 0.45	18.18 ± 0.45*	15.23 ± 3.02	10.50 ± 0.19	9.55 ± 0.85	8.81 ± 0.90	21.28 ± 0.88	13.51 ± 0.87	41.22 ± 0.32*		
182.16 ± 4.02*	180.16 ± 3.96	287.96 ± 3.68*	139.67 ± 11.14	83.40 ± 2.29*	83.58 ± 2.32*	133.51 ± 3.63	251.87 ± 3.44*	170.10 ± 2.90	299.74 ± 3.06*		
0.22 ± 0.03	0.59 ± 0.06*	0.47 ± 0.10*	0.29 ± 0.02	0.06 ± 0.00*	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.00	0.07 ± 0.00*	0.35 ± 0.05	0.07 ± 0.01*		
0.05 ± 0.00*	0.35 ± 0.02*	0.33 ± 0.05*	0.29 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.06	0.33 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.68 ± 0.08*		
0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.02*	0.00 ± 0.00	0.27 ± 0.01*		
2.17 ± 0.00*	2.31 ± 0.25*	2.28 ± 0.20*	1.56 ± 0.12	0.18 ± 0.01*	0.76 ± 0.05*	0.94 ± 0.08	0.37 ± 0.03*	2.10 ± 0.23	0.44 ± 0.01*		
0.56 ± 0.01	1.12 ± 0.11*	0.82 ± 0.08*	0.42 ± 0.06	0.02 ± 0.00*	0.57 ± 0.10	0.53 ± 0.01	0.05 ± 0.01*	0.54 ± 0.11	0.13 ± 0.05*		
0.01 ± 0.00*	0.17 ± 0.01	0.21 ± 0.04*	0.14 ± 0.00	0.00 ± 0.00*	0.19 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.00 ± 0.00*	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.02		
0.06 ± 0.01	0.14 ± 0.02*	0.14 ± 0.01*	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.15 ± 0.02*	0.04 ± 0.00	0.13 ± 0.00*		
0.10 ± 0.01*	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.12	0.28 ± 0.11	0.11 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.12 ± 0.02	0.02 ± 0.00		
0.04 ± 0.00*	0.38 ± 0.06	0.01 ± 0.00*	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00		
0.09 ± 0.02	1.96 ± 0.13*	1.17 ± 0.13*	0.58 ± 0.10	0.07 ± 0.02*	0.31 ± 0.06*	0.20 ± 0.09*	0.03 ± 0.00*	0.61 ± 0.05	0.03 ± 0.00*		
0.27 ± 0.03*	1.47 ± 0.11*	1.14 ± 0.07*	1.09 ± 0.35	3.73 ± 0.45	2.62 ± 0.57	0.52 ± 0.08	27.35 ± 0.48*	3.58 ± 0.45	58.59 ± 0.88*		
3.55 ± 0.10*	8.90 ± 0.80*	6.99 ± 0.80*	4.70 ± 0.88	4.28 ± 0.53	5.15 ± 0.88	2.98 ± 0.33	28.50 ± 0.61*	7.71 ± 0.97	60.44 ± 1.05*		
0.22 ± 0.06*	0.86 ± 0.07	0.43 ± 0.05	2.73 ± 0.51	1.95 ± 0.16	3.50 ± 0.06	2.42 ± 0.30	16.57 ± 0.45*	2.31 ± 0.11	35.22 ± 0.54*		
0.10 ± 0.00	0.25 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.37 ± 0.09	0.28 ± 0.08	0.41 ± 0.06	0.43 ± 0.12	0.13 ± 0.01*	0.32 ± 0.04	0.16 ± 0.06		
0.02 ± 0.00*	0.11 ± 0.01*	0.21 ± 0.00*	1.54 ± 0.10	0.07 ± 0.02*	2.35 ± 0.10	1.07 ± 0.11	1.82 ± 0.32	1.46 ± 0.09	4.68 ± 0.08*		
0.31 ± 0.01*	4.64 ± 0.12*	3.96 ± 0.43*	3.69 ± 0.14	0.19 ± 0.00*	3.53 ± 0.30	4.37 ± 0.11	0.43 ± 0.07*	4.78 ± 0.24*	0.71 ± 0.10*		
0.09 ± 0.02*	4.65 ± 0.61*	4.33 ± 0.47*	5.89 ± 0.57	0.01 ± 0.00*	4.42 ± 0.22	5.86 ± 0.34	0.23 ± 0.01*	8.08 ± 0.32	0.44 ± 0.09*		
0.01 ± 0.00*	1.50 ± 0.15*	0.71 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.01		
0.75 ± 0.09*	11.91 ± 0.97*	9.82 ± 0.96*	14.29 ± 1.46	2.49 ± 0.26*	14.24 ± 0.76	14.19 ± 0.98	19.22 ± 0.86	17.04 ± 0.82	44.34 ± 0.88*		
0.06 ± 0.02*	0.13 ± 0.01*	0.22 ± 0.02*	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.05*	0.06 ± 0.02		
0.04 ± 0.01	0.22 ± 0.01*	0.21 ± 0.08*	0.45 ± 0.01	0.00 ± 0.00*	0.39 ± 0.09	0.00 ± 0.00*	0.62 ± 0.07	0.02 ± 0.00*	0.82 ± 0.15*		
0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.00*	0.11 ± 0.04*	0.03 ± 0.00	0.00 ± 0.00*	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00*	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00		
0.08 ± 0.02*	0.13 ± 0.00*	0.12 ± 0.01*	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00		
3.38 ± 0.14*	1.52 ± 0.21	1.61 ± 0.08	1.04 ± 0.41	2.01 ± 0.42	1.75 ± 0.20	0.78 ± 0.04	2.00 ± 0.23	1.32 ± 0.13	1.03 ± 0.01		
3.57 ± 0.19*	2.09 ± 0.23	2.28 ± 0.21	1.62 ± 0.43	2.12 ± 0.45	1.27 ± 0.30	0.88 ± 0.05	2.76 ± 0.32	1.54 ± 0.19	1.96 ± 0.18		
1.11 ± 0.01	1.72 ± 0.14	1.66 ± 0.15	5.78 ± 0.15	5.44 ± 0.32	5.06 ± 0.13	3.68 ± 0.25	10.33 ± 0.85*	6.32 ± 0.28	14.34 ± 0.56*		

**Figure 2. Cobweb graph of mean sensory scores of wines made with five native strains of non-*Saccharomyces* and the control strain of *S. cerevisiae*.** A) p-Sc, pure culture of *S. cerevisiae*; p-Td, pure culture of *T. delbrueckii*; m-Td/Sc, mixed culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*; s-Td/Sc, sequential culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*. B) p-Sc, pure culture of *S. cerevisiae*; p-Sp, pure culture of *S. pombe*; m-Sp/Sc, mixed culture of *S. pombe* and *S. cerevisiae*; s-Sp/Sc, sequential culture of *S. pombe* and *S. cerevisiae*. C) p-Sc, pure culture of *S. cerevisiae*; p-Cs, pure culture of *C. stellata*; m-Cs/Sc, mixed culture of *C. stellata* and *S. cerevisiae*; s-Cs/Sc, sequential culture of *C. stellata* and *S. cerevisiae*. D) p-Sc, pure culture of *S. cerevisiae*; p-Mp, pure culture of *M. pulcherrima*; m-Mp/Sc, mixed culture of *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*; s-Mp/Sc, sequential culture of *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. E) p-Sc, pure culture of *S. cerevisiae*; p-Lt, pure culture of *L. thermotolerans*; m-Lt/Sc, mixed culture of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae*; s-Lt/Sc, sequential culture of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae*.



**Trials with *M. pulcherrima* CLI 457 and *S. cerevisiae* CLI 889**

As it was showed by *C. stellata* fermentation, the ability to conduct the fermentation of this yeast strain is low, as shown the four different curves (figure 1D). In these trials, *M. pulcherrima* CLI 457 strain, in pure and sequential cultures produced wines with low volatile acidity, 0.27 g L<sup>-1</sup> and 0.50 g L<sup>-1</sup> respectively, values less than the control p-Sc2 (0.63 g L<sup>-1</sup>) (Table 1). Besides, the pure use of this *M. pulcherrima* strain was characterized by a higher level of reducing sugars (152.93 g L<sup>-1</sup>) coinciding with a higher reduction of wine total acidity and a marked increase in pH value. The results have shown a significant decrease of volatile acidity and an increase of glycerol, most clearly evident in pure and sequential cultures of *M. pulcherrima* CLI 457 strain. This strain of *M. pulcherrima* and *C. stellata* CLI 920 are the largest glycerol producers compared to the other strains studied. A rise of acid lactic concentration in pure and co-cultures with this non-*Saccharomyces* strain (Table 1) can also be seen. However, as happened for *C. stellata*, the fermentation was not finished in any case.

*M. pulcherrima* in mixed culture and the control of *S. cerevisiae* have not presented significant sensorial differences by the tasters, the significance level was higher than 5% through triangle tests. In case of the use of *M. pulcherrima* in Malvar must fermentations, there was no clear preference on sensorial analysis, three of the seven panellists preferred the control, two of them chose the sequential culture and other two chose the mixed culture (Figure 2D). However, the tasters noted in these co-cultures ripe fruit, banana, sweet aromas associated with ethyl isovalerate and isoamyl acetate compounds and a slightly anise-like aroma probably due to ethyl hexanoate (Guth, 1997; Ferreira *et al.*, 2000) (Table 2). The tasters also noted the sweet character of the wine elaborated in pure culture of *M. pulcherrima* due to the high sugar concentration of the samples analyzed.

**Trials with *L. thermotolerans* 9-6C and *S. cerevisiae* CLI 889**

Previous pure cultures of non-*Saccharomyces* strains showed the lowest values of CO<sub>2</sub> released in comparison with other trials, however *L. thermotolerans* pure culture (p-Lt) presented a fermentation kinetics over the sequential culture of *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* (s-Lt/Sc) (Figure 1E). In sequential cultures with other non-*Saccharomyces* tested, it was noted when the *S. cerevisiae* inoculum was added (Sc in graphics) the CO<sub>2</sub> released was increased considerably, however in the sequential culture with *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* this increase in CO<sub>2</sub> released after adding *S. cerevisiae* (day 5) is not so obvious (Figure 1E). In these fermentations, it is possible to observe a two different patterns of CO<sub>2</sub> releasing, one including *S. cerevisiae* pure culture and mixed fermentation, and the other fermentation pattern that includes *L. thermotolerans* pure culture and the sequential fermentation (Figure 1E), as in the case of *S. pombe* fermentations. Biomass evolution in sequential culture of *L. thermotolerans* had also not presented an increase in cells per millilitre values after *S. cerevisiae* inoculation (data not shown).

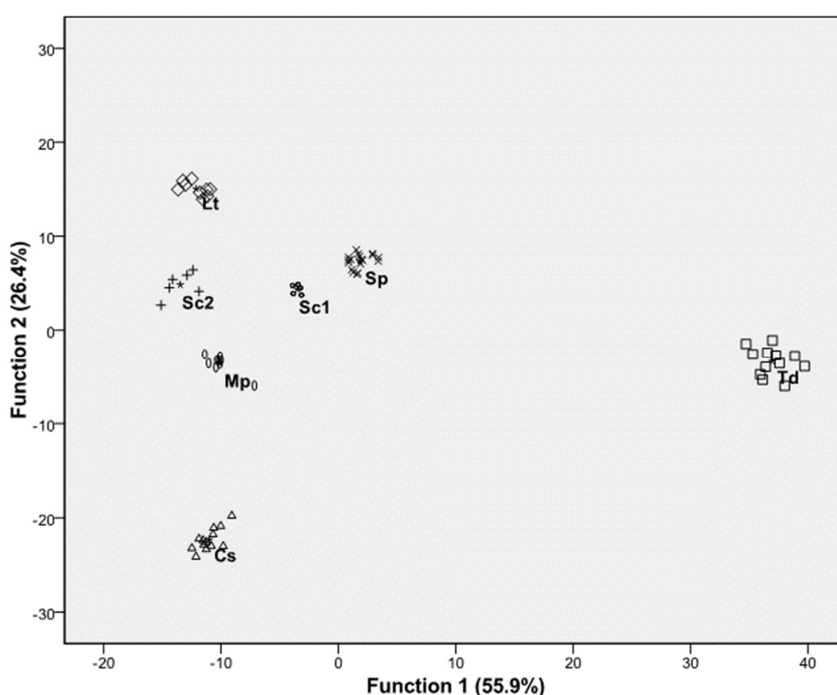
In Table 1, the ethanol production is seen to be similar in the mixed culture of *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* (m-Lt/Sc) and the control (p-Sc2), while wines from the fermentations of pure (p-Lt) and sequential (s-Lt/Sc) cultures of *L. thermotolerans* lower levels of ethanol were seen (7.19% and 7.29% (v/v), respectively), showing both fermentations a sugar content about 70 g L<sup>-1</sup>. Besides, a significant increase in total acidity and lactic acid in pure and sequential cultures of *L. thermotolerans* can be

observed, which coincided with a consequent reduction of pH and glycerol content. The values of volatile acidity were higher in pure ( $0.78 \text{ g L}^{-1}$ ) and sequential ( $0.77 \text{ g L}^{-1}$ ) with this non-*Saccharomyces* respect the control (p-Sc2).

Pure and sequential cultures of *L. thermotolerans* presented significant differences ( $p < 0.05$ ) in its aromatic composition with respect to the control (Table 2). These cultures were noted for their relation with higher alcohols, isobutanol and isoamyl alcohol and  $\beta$ -phenylethyl alcohol that produces a rose aroma; also, esters as ethyl isovalerate and ethyl lactate were found in their aromatic composition (Table 2). Ethyl lactate was the most abundant ester with values of  $27.35$  and  $58.59 \text{ mg L}^{-1}$  (pure and sequential cultures of *L. thermotolerans*, respectively), though their OAV values are lower than 1 (see Supplementary Material).

*L. thermotolerans* 9-6C strain in pure and sequential cultures had similar organoleptic characteristics according to taster conclusions, the significance level was higher than 5% through triangle tests. Besides, the preference of cultures was divided between mixed and sequential cultures of *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae*. They highlighted a high acidity flavour, higher aroma intensity and ripe fruit (pear) and floral aroma in pure and sequential cultures with *L. thermotolerans*; in mixed culture, the wine was valued by its freshness, citric aroma and full-bodied due to its lower acidity character (Figure 2E).

**Figure 3. Application of discriminant analysis to the data expressing as concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) of volatile compounds of the seven different trials** [Sc1, pure *S. cerevisiae* culture considered as a control in *T. delbrueckii*, *S. pombe* and *C. stellata* trials; Td, different cultures (pure, mixed, sequential) elaborated with *T. delbrueckii* CLI 918 strain; Sp, different cultures (pure, mixed, sequential) elaborated with *S. pombe* CLI 1085 strain; Cs, different cultures (pure, mixed, sequential) elaborated with *C. stellata* CLI 920 strain; Sc2, pure *S. cerevisiae* culture considered as a control in *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* trials; Mp, different cultures (pure, mixed, sequential) elaborated with *M. pulcherrima* CLI 457 strain; Lt, different cultures (pure, mixed, sequential) elaborated with *L. thermotolerans* 9-6C strain].



**Table 3. Standardized coefficients of the discriminant functions.** <sup>a</sup> Explained variance proportion (%)

Compound	Function		Compound	Function	
	1 (55.9) <sup>a</sup>	2 (26.4) <sup>a</sup>		1 (55.9) <sup>a</sup>	2 (26.4) <sup>a</sup>
Ethyl Isobutyrate	3.589	-1.470	(Z)-3-hexen-1-ol	5.728	-1.581
Diacetyl	-0.738	-0.861	Ethyl octanoate	-0.539	0.023
Ethyl Isovalerate	-1.882	-2.636	Furfural	-1.771	-1.630
1-propanol	-0.046	0.644	Ethyl-3-hidroxybutyrate	-0.986	-0.068
Isobutanol	0.879	-1.798	$\gamma$ -butyrolactone	-0.353	0.855
Isoamyl acetate	3.235	-2.730	Isovaleric acid	0.142	0.014
1-butanol	2.067	1.201	Metionol	2.151	-2.242
Isoamyl alcohol	4.692	1.412	2-phenylethyl acetate	-0.435	2.373
Ethyl hexanoate	1.999	-1.550	Hexanoic acid	-5.197	-5.135
Hexyl acetate	1.196	-0.521	Benzyl alcohol	-0.623	-0.321
Acetoin	1.74	0.513	$\beta$ -phenylethyl alcohol	-0.893	2.739
Ethyl lactate	-0.531	2.552	Octanoic acid	3.737	9.873
1-hexanol	2.85	3.836	Decanoic acid	-0.838	-1.386

### Discriminant Function Analysis (DFA)

When stepwise discriminant function analysis was applied to the 32 aromatic compounds analysed for each trial, six discriminant functions were obtained; the first two accounted for 55.9% and 26.4% of the total variance, respectively, so the total variance explained by these two functions was 82.3% (Figure 3). The two discriminant functions allowed us to correctly classify 100% of studied samples. Also, 100% of samples were correctly classified in cross-validation where each case is classified by functions obtained from the rest of the cases. The variables that contributed most to discriminant model were hexanoic acid and isoamyl acetate which negatively correlated with discriminant function 1 and positively correlated with the same function were (Z)-3-hexen-1-ol, isoamyl alcohol, octanoic acid, ethyl isobutyrate and metionol (Table 3). In relation with discriminant function 2, hexanoic acid and ethyl isovalerate were most negatively correlated with this function and positively correlated were octanoic acid, 1-hexanol,  $\beta$ -phenylethyl alcohol, ethyl lactate and 2-phenylethyl acetate (Table 3). Figure 3 shows the distribution in the discriminant space of the different type of cultures with *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains classified by trial. It is necessary to emphasize the clear classification respect on the aromatic composition of wines obtained depending on the non-*Saccharomyces* employed in the fermentation process. *T. delbrueckii* and *C. stellata* trials showed the highest differences in its aromatic composition with respect to their control (Sc2) (Figure 3).

### DISCUSSION

Over the last few years, there has been an increase in the use of native yeasts for the control of the fermentation process. Native strains are well known to have adapted to all conditions associated with a wine production area, which allow them to have good fermentation abilities (Tello *et al.*, 2012; Tristezza *et al.*, 2012; García *et al.*, 2016). Moreover, the use of these autochthonous yeasts contributes to obtain wines with specific local characteristics and styles, avoiding the apparent problem of deficit of sensorial diversity among industrial wines (Ugliano, 2009). Also, there has been increasing interest



in mimicking the indigenous fermentation, but in a controlled way, thus obtaining wines with higher flavour and aroma complexity.

It is widely known that fermentation kinetics could be influenced by non-*Saccharomyces* wine yeasts in fermentations with starter cultures of *S. cerevisiae* (Heard and Fleet, 1988; Ciani *et al.*, 2006). In this work, the impact on fermentation kinetics by multistarter cultures has been shown. The expected presence of these yeasts strains during the early stages of fermentation was enough to produce a real impact on the final wines. This presence of non-*Saccharomyces* strains could have been encouraged by the temperature of fermentation since it was reported that the tolerance of non-*Saccharomyces* to ethanol is favoured at 10-20 °C (Fleet and Heard, 1989; Erten, 2002). Furthermore, in a previous study about different fermentation stresses (osmotic pressure, pH and ethanol), the non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* strains studied showed a good tolerance to those stresses inherent to fermentation (García *et al.*, 2016).

In agreement with previous publications, the use of *T. delbrueckii* has been linked to reduced amounts to volatile acidity compared to the control of *S. cerevisiae* strains (Ciani and Maccarelli, 1998; Renault *et al.*, 2009). In this work, the ethanol lowering in sequential culture of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* could be related to Crabtree-positive metabolism of *T. delbrueckii* species described by several authors (Alves-Araújo *et al.*, 2007; Bely *et al.*, 2008). And contrary to previous findings (Bely *et al.*, 2008; Loira *et al.*, 2014), this strain of *T. delbrueckii* increased the glycerol content in pure and sequential elaborations. Also, it should be noted that this *T. delbrueckii* CLI 918 strain has been described earlier as a strain with potential interest for its contribution to the aromatic wine profile adding flowery and fruity notes and its use was considered interesting in mixed starter cultures with *S. cerevisiae* (Cordero-Bueso *et al.*, 2013).

It is well known that *S. pombe* can metabolise the malic acid (Snow, 1978; Benito *et al.*, 2014). The strain *S. pombe* CLI 1085 was able to metabolise malic acid in pure and sequential cultures and the reduction of volatile acidity in the same cultures differs from other investigations where *S. pombe* strains produced a high volatile acidity and could be associated with aroma defects (Tristezza *et al.*, 2010; Benito *et al.*, 2012).

The use of *C. stellata* as a starter culture to increase glycerol level in wines was suggested by Maurizio Ciani and Picciotti (1995). This yeast specie is known as a high glycerol producer achieving values up to 14 g L<sup>-1</sup> (Ciani and Ferraro, 1998; Ciani and Maccarelli, 1998). In contrast, *S. cerevisiae* produced between 4 and 10.4 g L<sup>-1</sup> of glycerol (Radler and Schütz, 1981; Prior *et al.*, 2000). Glycerol contributes to the mouthfeel and complexity of wine flavour at lower levels (Prior *et al.*, 2000) and concentrations over 5.2 g L<sup>-1</sup> can produce a sweet taste (Noble, 1984). The mixed culture of *C. stellata* CLI 920 and *S. cerevisiae* CLI 889 presented higher ethanol content than the control and these results are different from the previously published on co-cultures of *C. stellata* employed to reduce the final ethanol content (Ferraro *et al.*, 2000; Canonico *et al.*, 2016). Mixed and sequential cultures of *C. stellata* CLI 920 and *S. cerevisiae* CLI 889 were characterized by increased esters concentration. Some researchers have indicated that medium-chain fatty acids as hexanoic, octanoic and decanoic acids at concentration of 4 to 10 mg L<sup>-1</sup> impart mild and pleasant aroma to wine; however, at levels beyond 20 mg L<sup>-1</sup>, their impact on wine becomes negative (Shinohara, 1985; Jiang and Zhang, 2010). In the present work, *C. stellata* mixed and sequential cultures produced high concentrations

Published by European Centre for Research Training and Development UK ([www.eajournals.org](http://www.eajournals.org))

of hexanoic, octanoic and decanoic acids that might have a positive impact on the aroma of these wines since their levels were far below 20 mg L<sup>-1</sup>.

Some authors have reported that *M. pulcherrima* in monoculture is a low producer of volatile acidity (Cominiti *et al.*, 2011; Sadoudi *et al.*, 2012). This behaviour was maintained by *M. pulcherrima* CLI 457 strain in pure and sequential culture. In a previous study, Jolly *et al.* (2003) did not detect any relevant changes in chemical composition and fermentative kinetics between *M. pulcherrima* in association with *S. cerevisiae* cultures compared to pure cultures of *S. cerevisiae*; however, *M. pulcherrima* CLI 457 showed a significant decrease of volatile acidity and an increase of glycerol and lactic acid, most clearly evident in pure and sequential cultures with this non-*Saccharomyces*. Also, one *M. pulcherrima* strain commercially available for winemaking has been studied due to its influence on the wine flavour profile (González-Royo *et al.*, 2015).

The ability of *L. thermotolerans* to act as an acidifying agent (lactic acid producer) is being considered as a tool to acidify low-acid musts (Kapsopoulou *et al.*, 2007; Benito *et al.*, 2015). In terms of fermentation kinetics in sequential culture with *L. thermotolerans* 9-6C and *S. cerevisiae* CLI 889, the fermentation was not dominated by *S. cerevisiae*; this behaviour could be owed to the enhanced competition of this non-*Saccharomyces* yeast in the delayed inoculation of *S. cerevisiae* (Kunkee and Bisson, 1993; Mendoza *et al.*, 2007), which will probably be produced by competition for nitrogen, as has been previously noticed (Ciani *et al.*, 2006) or probably due to an excessive acidity into the wine produced by *L. thermotolerans* previous to *S. cerevisiae* inoculation. Some studies (Gobbi *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2015) showed that the volatile acidity production in pure and co-cultures with *L. thermotolerans* was significantly reduced while the amount of glycerol can be increased in the same cultures. In our results, the behaviour of *L. thermotolerans* 9-6C strain was completely different in pure and sequential cultures, glycerol decreased in these two cultures and the volatile acidity was increased although these values are high, do not exceed 1 g L<sup>-1</sup> (Erasmus *et al.*, 2004) that could have a negative impact on organoleptic quality of wine. By contrast, our results were coincident with what other authors had also reported on *L. thermotolerans* capacity of  $\beta$ -phenylethyl alcohol production in fermentations with *S. cerevisiae* (Kapsopoulou *et al.*, 2007; Gobbi *et al.*, 2013). Even though ethyl lactate was the most abundant ester in pure and sequential cultures of *L. thermotolerans*, the real contribution of ethyl lactate and diethyl succinate to the D.O. "Vinos de Madrid" white wines had been previously considered as insignificant (Gil *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2004).

The influence of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile profile of wines has been widely researched. The significant increment of  $\beta$ -phenylethyl alcohol in the co-cultures of *T. delbrueckii*, *C. stellata* and *L. thermotolerans* seems to be related to the metabolic activity of these non-*Saccharomyces*. This volatile compound contributes with a pleasant floral aroma (rose) in the wine (Swiegers *et al.*, 2005) and also is produced by others non-*Saccharomyces* in mixed culture (Andorrà *et al.*, 2010). It is worth noting that there have been produced a large amount of higher alcohols in pure and sequential cultures of *T. delbrueckii*, *C. stellata* and *L. thermotolerans* in comparison with their respective controls (Table 3). These compounds can have a positive or negative impact on the flavour and aroma of a wine depending on its final concentration (Beltran *et al.*, 2005). Higher alcohols concentrations below 300 g L<sup>-1</sup> add a desirable level of complexity to wine, while concentrations above 400 mg L<sup>-1</sup> can have a detrimental effect (Rapp and Versini, 1995).



## CONCLUSION

In summary, the non-*Saccharomyces* strains studied can be used to elaborate wines with different organoleptic requirements. *T. delbrueckii* CLI 918 could be used to produce wines with lower ethanol content and higher fruity and floral aroma. *S. pombe* CLI 1085, though not provide special sensorial characteristics to Malvar wines, could be employed to consume malic acid aimed at achieving the microbiological stabilization and to produce wines with low volatile acidity. *C. stellata* CLI 920 was distinguished for its higher aroma complexity with high concentration in desirable aroma compounds and higher glycerol content, pure culture with this strain could be considered for sweet wine elaboration. *M. pulcherrima* CLI 457 contributed to lower volatile acidity and increase glycerol content, also produces ripe fruit aroma. *L. thermotolerans* 9-6C can be useful for increasing the acidity of wines produced from low acidity musts due to its ability to produce lactic acid.

There is special mention in the results obtained about the best moment to inoculate *S. cerevisiae*. Depending on the strain of non-*Saccharomyces* used, we can conclude that is better to inoculate on sequential way or mixed at the beginning of fermentation. It is possible to observe two different types of fermentation kinetics regarding mixed and *S. cerevisiae* pure fermentations. For mixed fermentation, it seems that there are not significant differences on both CO<sub>2</sub> releasing curves for the species *T. delbrueckii*, *S. pombe* and *L. thermotolerans*, while *M. pulcherrima* exhibited a slight difference, but for *C. stellata* we can observe the highest difference. This fact could be explained because the interaction between both yeast species, there are some cases in which the presence of the non-*Saccharomyces* yeast strains affects the fermentation behaviour of *Saccharomyces*; however, for other yeasts species this interaction does not affect significantly. This interaction has been described (Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) as the result of different consequences, as the production of some metabolites and the change in the concentration of certain metabolites on the media. However, the different behaviour can be explained also, because not all the non-*Saccharomyces* yeast species and all the different strains of the same species showed the same behaviour (Wang *et al.*, 2016).

However, when comparing the sequential fermentation with the pure fermentation of non-*Saccharomyces* strains, we can also observe two different types of fermentation kinetics. For yeast species *T. delbrueckii*, *C. stellata* and *M. pulcherrima* an increase on the CO<sub>2</sub> release is observed after *S. cerevisiae* inoculation, while for *S. pombe* or *L. thermotolerans* there are no significant differences among both curves. This fact cannot be explained by the presence of metabolites produced by *S. cerevisiae*, because this fact is observed after *S. cerevisiae* inoculation. In this case, this different behaviour could be explained due to the different uptake of nitrogen compounds (as well-known limiting factor in a wine fermentation) in the media (Andorrà *et al.*, 2012). It seems that *L. thermotolerans* and *S. pombe* exhibited higher nutritional requirements than the other species, because when *S. cerevisiae* is inoculated, there is not as much of an increase of the CO<sub>2</sub> release as was expected.

The results of the present study show that sequential cultures of all trials had organoleptic properties closer to pure cultures of non-*Saccharomyces* tested than the control. This type of inoculation in each trial maintained the organoleptic characteristics of its non-*Saccharomyces* pure culture, moreover a higher aroma complexity and higher floral and fruity aroma have been detected by the sensorial panel. Although it should be noted that

almost all of sequential cultures, except for the *T. delbrueckii* sequential culture, were not able to consume all sugars present in must.

In conclusion, the use of the inoculation of different yeast species on a wine fermentation can improve the sensory properties of Malvar wines. However, depending of the non-*Saccharomyces* yeast strain inoculated, it may be better to use sequential or mixed fermentation. Although the highest differences with respect to the control were observed for sequential inoculation, these differences could be result of stuck or sluggish fermentation. To prevent this behaviour an earlier inoculation of *Saccharomyces* should be done for sequential inoculation. However, for mixed fermentation, in all cases the fermentations were finished, showing the effect of the presence of the non-*Saccharomyces* yeast species on the sensory analysis of the final wines obtained.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Project RM2010-00009-C03-01 funded by INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria). M. García acknowledges the IMIDRA for his grant.

### CORRESPONDING AUTHOR

\*E-mail: [teresa.arroyo@madrid.org](mailto:teresa.arroyo@madrid.org); Tel.: +34 918879486; fax: +34 918879492.

### REFERENCES

- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M. J., Spencer-Martins, I., Leão, C. and Sousa, M. J. (2007). *Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast Torulaspora delbrueckii*, Microbiology, 153 (3), 898-904.
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. and Guillamón, J. M. (2012). *Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile*, LWT - Food Science and Technology, 49 (1), 8-13.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M. and Esteve-Zarzoso, B. (2010). *Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations*, European Food Research and Technology, 231 (2), 215-224.
- Arroyo, T. (2000). Estudio de la influencia de diferentes tratamientos enológicos en la evolución de la microbiota y en la calidad de los vinos elaborados con la variedad "Airén", en la D.O. "Vinos de Madrid." University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain.
- Arroyo, T., Cordero, G., Serrano, A. and Valero, E. (2010).  *$\beta$ -Glucosidase production by yeasts isolated from vineyard*, In Expression of Multidisciplinary Flavour Science. (Eds, Blank, I., Wüst, M. and Yeretian, C.) Winterthur, Switzerland, pp. 359-362.
- Arroyo, T., Lozano, J., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., Santos, J. P. and Horrillo, C. (2009). *Evaluation of wine aromatic compounds by a sensory human panel and an electronic nose*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (24), 11543-11549.
- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J. M. and Aznar, M. (2013). *Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines*. Food Research International, 53 (1), 252-259.

- Beltran G, Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A. and Guillamón, J. M. (2005). *Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 996-1002.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. and Dubourdieu, D. (2008). *Impact of mixed Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation*, International Journal of Food Microbiology, 122 (3), 312-320.
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S., Ebeler, S. and Hopfer, H. (2015). *Combine use of selected Schizosaccharomyces pombe and Lachancea thermotolerans yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production*, Molecules, 20, 9510-9523.
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J. and Rauhut, D. (2015). *Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-Saccharomyces and Saccharomyces cerevisiae*, European Food Research and Technology, 241 (5), 707-717.
- Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palomero, D. and Suárez-Lepe, J. A. (2014). *Selection of appropriate Schizosaccharomyces strains for winemaking*, Food Microbiology, 42, 218-224.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F. and Suárez-Lepe, J. A. (2012). *New applications for Schizosaccharomyces pombe in the alcoholic fermentation of red wines*, International Journal of Food Science and Technology, 47 (10), 2101-2108.
- Bisson, L. (1999). *Stuck and sluggish fermentations*, American Journal of Enology and Viticulture, 50 (1), 107-119.
- Bisson L. F. and Kunkee, R. (1991). *Microbial interactions during wine production*. In Mixed Cultures in Biotechnology. (Eds, Zeikus, J. G and Johnson, E. A.) New York, McGraw-Hill, pp. 37-58.
- Bisson, L. F. and Kunkee, R. (1993). *Microbial interactions during wine production*. In Mixed Cultures in Biotechnology. (Eds, Zeikus, J. G and Johnson, E. A.) New York, NY, McGraw-Hill, pp. 37-68.
- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L. and Ciani, M. (2016). *Sequential fermentation with selected immobilized non-Saccharomyces yeast for reduction of ethanol content in wine*, Frontiers in Microbiology, 7 (278), 1-11.
- Ciani, M., Beco, L. and Comitini, F. (2006). *Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations*, International Journal of Food Microbiology, 108 (2), 239-245.
- Ciani, M. and Ferraro, L. (1998). *Combined use of immobilized Candida stellata cells and Saccharomyces cerevisiae to improve the quality of wines*, Journal of Applied Microbiology, 85 (2), 247-254.
- Ciani, M. and Maccarelli, F. (1998). *Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making*, World Journal of Microbiology and

Biotechnology, 14 (2), 199-203.

Ciani, M. and Picciotti, G. (1995). *The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making*, Biotechnology Letters, 17 (11), 1247-1250.

Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J. and Rodríguez-Vico, F. (2005). *Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation*, International Journal of Food Microbiology, 98 (3), 301-308.

Cominiti, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2011). *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae*, Food Microbiology, 28 (5), 873-882.

Contreras, A., Curtin, C. and Varela, C. (2014). *Yeast population dynamics reveal a potential 'collaboration' between Metschnikowia pulcherrima and Saccharomyces uvarum for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation*, Applied Microbiology and Biotechnology, 99 (4), 1885-1895.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D. and Valero, E. (2011). *Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries*, International Journal of Food Microbiology, 145 (1), 132-

Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M. and Arroyo, T. (2013). *Biotechnological potential of non-Saccharomyces yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (Vitis vinifera cv. L.)*, European Food Research and Technology, 236 (1), 193-207.

Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Gil-Díaz, M., García, M., Cabellos, J. and Arroyo, T. (2016). *Improvement of Malvar wine quality by use of locally-selected Saccharomyces cerevisiae strains*, Fermentation, 2 (7), 1-13.

Erasmus, D. J., Cliff, M. and Van Vuuren, H. J. J. (2004). *Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine*, American Journal of Enology and Viticulture, 55 (4), 371-378.

Erten, H. (2002). *Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of Kloeckera apiculata and Saccharomyces cerevisiae associated with winemaking in mixed cultures*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18 (4), 373-378.

Esteve-Zarzoso, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F. and Querol, A. (2000). *Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the "El Penedès" area (Spain)*, Food Microbiology, 17 (5), 553-562.

Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D. and Querol, A. (1998). *The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking*, International Microbiology, 1 (2), 143-

Ferraro, L., Fatichenti, F. and Ciani, M. (2000). *Pilot scale vinification process using immobilized Candida stellata cells and Saccharomyces cerevisiae*, Process Biochemistry, 35 (10), 1125-1129.

- Ferreira, V., López, R. and Cacho, J. F. (2000). *Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80 (11), 1659-1667.
- Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R. and Cacho, J. (2002). *Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: Aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (14), 4048-4054.
- Fleet, G. H., Heard, G.M. and Gao, C. (1989). *The effects of temperature on the growth and ethanol tolerance of yeasts during wine fermentation*, Yeast, 45, 43-46.
- Fowell, R. R. (1965). *The identification of wild yeast colonies on lysine agar*, Journal of Applied Bacteriology, 28 (3), 373-383.
- García, M., Greetham, D., Wimalasena, T. T., Phister, T. G., Cabellos, J. M. and Arroyo, T. (2016). *The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates*, Journal of Applied Microbiology, 121 (1), 215-233.
- Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T. and Prodanov, M. (2006). *Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin "Vinos de Madrid" (Spain)*, Analytica Chimica Acta, 563 (1-2 SPEC. ISS.), 145-153.
- Gil, J. V., Mateo, J. J., Jiménez, M., Pastor, A. and Huerta, T. (1996). *Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts*, Journal of Food Science, 61 (6), 1247-1250.
- Giovani, G., Rosi, I. and Bertuccioli, M. (2012). *Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-Saccharomyces yeast strains during alcoholic fermentation*, International Journal of Food Microbiology, 160 (2), 113-118.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine*, Food Microbiology, 33 (2), 271-281.
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. M. and Zamora, F. (2015). *Oenological consequences of sequential inoculation with non-Saccharomyces yeasts (Torulaspora delbrueckii or Metschnikowia pulcherrima) and Saccharomyces cerevisiae in base wine for sparkling wine production*, European Food Research and Technology, 240 (5), 999-1012.
- Gump, B. H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C. and Whiton, R. S. (2002). *Comparison of analytical methods for prediction of pre-fermentation nutritional status of grape juice*, American Journal of Enology and Viticulture, 53 (4), 325-329.
- Guth, H. (1997). *Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43 (Table 1), 3027-3032.



- Heard, G. and Fleet, G. H. (1988). *The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice*, Journal of Applied Bacteriology, 65, 23-28.
- Jackson, R. S. (2008). *Chemical constituents of grapes and wines*. In Wine Science: Principles and Applications, San Diego, CA, Academic Press, 3rd ed, pp. 303
- Jiang, B. and Zhang, Z. (2010). *Volatile compounds of young wines from cabernet sauvignon, cabernet gernischet and chardonnay varieties grown in the loess plateau region of China*, Molecules, 15 (12), 9184-9196.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M. and Nerantzis, E. (2007). *Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of Kluyveromyces thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23 (5), 735-739.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, S., Cintora, I. and Suárez-Lepe, J. A. (2014). *Influence of sequential fermentation with Torulaspora delbrueckii and Saccharomyces cerevisiae on wine quality*, LWT - Food Science and Technology, 59 (2P1), 915-922.
- Mendoza, L. M., De Nadra, M. C. M. and Fariás, M. E. (2007). *Kinetics and metabolic behaviour of a composite culture of Kloeckera apiculata and Saccharomyces cerevisiae wine related strains*, Biotechnology Letters, 29 (7), 1057- 1063.
- Moyano, L., Zea, L., Moreno, J. and Medina, M. (2002). *Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (25), 7356-7361.
- Noble, A. C. and Bursick, G. F. (1984). *The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine*, American Journal of Enology and Viticulture, 35 (2), 110-
- Prior, B. A., Toh, T. H., Jolly, N., Baccari, C. and Mortimer, R. K. (2000). *Impact of yeast breeding for elevated glycerol production on fermentative activity and metabolite formation in Chardonnay wine*, South African Journal of Enology and Viticulture, 21 (2), 92-99.
- Radler, F. and Schütz, H. (1981). *Glycerol production of various strains of Saccharomyces*, American Journal of Enology and Viticulture, 33 (1), 36-40.
- Rapp, A. and Versini, G. (1995). *Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines*, Developments in Food Science, 37, 1659-1694.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A. and Bely, M. (2009). *Genetic characterization and phenotypic variability in Torulaspora delbrueckii species: Potential applications in the wine industry*, International Journal of Food Microbiology, 134 (3), 201-210.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F. and Manzanares, P. (2003). *Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations*, International Journal of Food Microbiology, 86 (1-2), 181-188.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., ISSN 2056-5798(Print), ISSN 2056-5801(online)

- Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J. and Alexandre, H. (2012). *Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts*, Food Microbiology, 32 (2), 243-253.
- Santos, J. P., Arroyo, T., Aleixandre, M., Lozano, J., Sayago, I., García, M., Fernández, M. J., Arés, L., Gutiérrez, J., Cabellos, J. M., Gil, M. and Horrillo, M. C. (2004). *A comparative study of sensor array and GC-MS: Application to Madrid wines characterization*, Sensors and Actuators, B: Chemical, 102 (2), 299-307.
- Shinohara, T. (1985). *Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines*, Agricultural and Biological Chemistry, 49 (7), 2211-2212.
- Snow, P. G. and Gallander, J. F. (1978). *Deacidification of white table wines through partial fermentation with Schizosaccharomyces pombe*, American Journal of Enology and Viticulture, 30 (1), 50-55.
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M. and Zhao, Y. P. (2014). *Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines*, Food Microbiology, 44 (5), 15-23.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. and Pretorius, I. S. (2005). *Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 11 (2), 139-173.
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M. and Arroyo, T. (2012). *Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts*, Journal of Applied Microbiology, 112 (2), 302-315.
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2010). *Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants*, Annals of Microbiology, 60 (3), 549-556.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., Mita, G., Spano, G. and Grieco, F. (2012). *Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39 (1), 81-92.
- Ugliano, M. and Henschke, P. A. (2009). *Yeasts and wine flavour*, In Wine Chemistry and Biochemistry. (Eds, Polo, M. C. and Moreno-Arribas, M. V.) New York, Springer Science Business, pp. 313-392
- Van Kerken, A. (1963). *Contribution to the ecology of yeasts occurring in wine*, University of the Orange Free State, Bloemfontein, South Africa.
- Vaughnan-Martini, A. and Martini, A. (1999). *Determination of ethanol production*. In The Yeast. A Taxonomic Study. (Eds, Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.) Amsterdam, Elsevier, pp. 107-108.
- Wang, C., Mas, A. and Esteve-Zarzoso, B. (2015). *Interaction between Hanseniaspora uvarum and Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation*, International Journal of Food Microbiology, 206, 67-74.



Wang, C., Mas, A. and Esteve-Zarzoso, B. (2016). *The interaction between Saccharomyces cerevisiae and non-Saccharomyces yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific*, Frontiers in Microbiology, 7 (502), 1-11.

**Table S1, Supplementary Material. ODE (odour description), OTV (odour threshold value, mg L<sup>-1</sup>, Balboa-Lagunero et al. 2013) and OAV (odour activity values; OAV = x/OTH, where x is the concentration mean value of each volatile compound) of pure (p), mixed (m) and sequential (s) cultures made with *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains (Td, *T. delbrueckii*; Sp, *S. pombe*; Cs, *C. stellata*; Mp, *M. pulcherrima*; Lt, *L. thermotolerans*).<sup>a</sup> *S. cerevisiae* pure culture p-Sc1 was taken as the control in *T. delbrueckii* – *S. cerevisiae*, *C. stellata* – *S. cerevisiae* trials; *S. cerevisiae* pure culture p-Sc2 was taken as control in *M. pulcherrima* – *S. cerevisiae* and *L. thermotolerans* – *S. cerevisiae* trials.**

Compound	ODE	OTV	OA V <i>S. cerevisiae</i> OA V <i>T. delbrueckii</i> - <i>S. cerevisiae</i> OA V <i>S. pombe</i> - <i>S. cerevisiae</i> OA V <i>C. stellata</i> - <i>S. cerevisiae</i>									
			p-Sc1 <sup>a</sup>	p-Td	m-Td/Sc	s-Td/Sc	p-Sp	m-Sp/Sc	s-Sp/Sc	p-Cs	m-Cs/Sc	s-Cs/Sc
1-Propanol	Alcohol, ripe fruit	9	0.35	0.40	0.41	0.22	0.30	0.22	0.22	0.41	0.75	0.95
1-Butanol	Soap, fatty, diesel	150	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Isobutanol	Bitter, fusel, alcohol	40	0.41	0.74	0.39	0.82	0.84	0.35	0.63	2.54	0.66	2.30
Isoamyl alcohol	Harsh, bitter	30	2.98	4.66	3.88	7.73	2.30	3.55	2.35	1.75	4.41	5.52
(Z)-3-Hexen-1-ol	Lemon, fresh	0.4	0.26	0.75	1.42	0.49	0.30	0.31	0.27	0.33	0.45	0.27
1-Hexanol	Green grass, fresh	8	0.11	0.25	0.11	0.10	0.09	0.07	0.03	0.08	0.11	0.05
Metionol	Garlic	1	0.41	1.86	0.57	2.03	0.72	0.82	0.36	0.63	0.70	0.51
Benzyl alcohol	Pleasant, soft	200	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
β-Phenylethyl alcohol	Flowery, roses	14	0.76	2.07	0.91	1.65	0.97	1.81	0.68	1.63	1.01	1.30
Ethyl butyrate	Fruity, sweet, apple	0.02	7.33	9.20	5.40	4.61	4.32	10.01	15.73	10.91	29.76	25.05
Ethyl isovalerate	Fruity, sweet, banana	0.003	78.43	199.93	72.98	81.97	73.25	98.05	73.23	15.04	118.63	109.34
Ethyl isobutyrate	Fruity, pineapple	0.015	0.00	182.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Isoamyl acetate	Banana, sweet, fruity	0.03	20.04	8.02	13.13	14.18	8.25	24.43	10.03	72.26	77.21	76.54
Ethyl hexanoate	Pineapple, apple	0.014	28.03	15.27	23.91	41.39	14.66	23.75	24.74	39.66	79.72	58.28
Ethyl-3-hydroxybutyrate	Fruity	20	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01
Hexyl acetate	Fruity, green, pear	1	0.04	0.11	0.06	0.12	0.04	0.03	0.03	0.06	0.14	0.13
2-Phenylethyl acetate	Flowery, lilac	0.25	3.31	0.49	3.43	3.94	6.83	4.99	8.49	0.41	1.66	1.72
Diethyl succinate	Camphor	100	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ethyl octanoate	Fresh, flowery, pineapple	0.58	0.77	0.35	1.52	0.58	0.89	1.09	0.92	0.16	3.39	1.96
Ethyl lactate	Sour milk	154	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01
Isobutyric acid	Rancid, butter, cheese	0.05	18.24	4.62	18.16	11.09	107.43	14.15	18.24	4.41	17.24	8.42
Butyric acid	Butter, cheese, stinky	0.173	1.68	0.56	1.14	0.31	3.44	0.79	0.39	0.58	1.45	1.02
Isovaleric acid	Cheese	0.033	16.40	0.37	21.78	2.98	7.21	14.25	4.53	0.70	1.69	6.36
Hexanoic acid	Cheese	0.42	6.84	4.14	7.46	5.44	7.14	7.64	9.03	0.74	11.06	9.46
Octanoic acid	Sweet, cheesy	0.5	4.22	2.27	4.44	2.22	2.29	6.14	6.65	0.18	9.27	8.76
Decanoic acid	Rancid, fatty	1	0.56	0.23	0.73	0.55	0.18	0.94	0.48	0.01	1.50	0.73
Diacetyl	Butter	0.1	0.00	1.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.62	1.37	2.23
Furfural	Bread, toasty, candy	15	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
Benzaldehyde	Sweet, candy, wood	5	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02
Phenylacetaldehyde	Roses	1	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.13	0.12
Acetoin	Butter	150	0.01	0.01	0.00	0.01	0.39	0.01	0.05	0.02	0.01	0.01
γ-Butyrolactone	Coconut	35	0.03	0.00	0.03	0.01	0.05	0.01	0.01	0.03	0.05	0.05

Table S1, Supplementary Material (Continued)

Compound	ODE	OTV	OAV <i>S. cerevisiae</i>		OAV <i>M. pulcherrima</i> – <i>S. cerevisiae</i>		OAV <i>L. thermotolerans</i> – <i>S. cerevisiae</i>		
			p-Sc2 <sup>a</sup>	p-Mp	m-Mp/Sc	s-Mp/Sc	p-Lt	m-Lt/Sc	s-Lt/Sc
1-Propanol	Alcohol, ripe fruit	9	0.70	0.19	0.23	0.28	1.35	1.50	1.76
1-Butanol	Soap, fatty, diesel	150	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Isobutanol	Bitter, fusel, alcohol	40	0.34	1.08	0.26	1.00	1.23	0.40	1.37
Isoamyl alcohol	Harsh, bitter	30	3.46	0.91	2.03	2.71	5.60	4.20	6.26
(Z)-3-Hexen-1-ol	Lemon, fresh	0.4	0.08	0.06	0.06	0.07	0.15	0.10	0.15
1-Hexanol	Green grass, fresh	8	0.03	0.01	0.01	0.01	0.12	0.06	0.03
Metionol	Garlic	1	0.20	0.04	0.10	0.10	0.21	0.21	0.53
Benzyl alcohol	Pleasant, soft	200	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
β-Phenylethyl alcohol	Flowery, roses	14	1.09	0.75	0.68	0.63	1.52	0.96	2.92
Ethyl butyrate	Fruity, sweet, apple	0.02	14.41	2.80	8.11	9.54	3.48	17.73	3.73
Ethyl isovalerate	Fruity, sweet, banana	0.003	97.15	27.03	100.07	117.78	109.28	85.38	226.32
Ethyl isobutyrate	Fruity, pineapple	0.015	0.00	1.87	0.00	0.00	9.10	0.00	17.86
Isoamyl acetate	Banana, sweet, fruity	0.03	52.14	5.97	25.18	31.14	12.43	69.86	14.66
Ethyl hexanoate	Pineapple, apple	0.014	30.02	1.34	40.72	37.41	3.92	38.51	9.00
Ethyl-3-hydroxybutyrate	Fruity	20	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00
Hexyl acetate	Fruity, green, pear	1	0.05	0.04	0.06	0.05	0.15	0.04	0.13
2-Phenylethyl acetate	Flowery, lilac	0.25	1.12	0.43	0.65	0.25	0.04	0.48	0.09
Diethyl succinate	Camphor	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ethyl octanoate	Fresh, flowery, pineapple	0.58	1.00	0.11	0.54	0.33	0.05	1.05	0.05
Ethyl lactate	Sour milk	154	0.01	0.02	0.02	0.00	0.18	0.02	0.38
Isobutyric acid	Rancid, butter, cheese	0.05	54.69	39.05	69.97	48.77	331.40	46.16	705.15
Butyric acid	Butter, cheese, stinky	0.173	2.15	1.60	2.37	2.46	0.73	1.83	0.98
Isovaleric acid	Cheese	0.033	46.80	2.00	71.10	31.96	55.05	44.33	142.47
Hexanoic acid	Cheese	0.42	8.79	0.46	8.42	10.37	1.03	11.38	1.79
Octanoic acid	Sweet, cheesy	0.5	11.78	0.01	8.79	11.75	0.47	16.16	0.89
Decanoic acid	Rancid, fatty	1	0.06	0.00	0.02	0.02	0.04	0.10	0.13
Diacetyl	Butter	0.1	0.64	1.10	0.63	0.85	1.19	1.29	0.57
Furfural	Bread, toasty, candy	15	0.03	0.00	0.03	0.00	0.04	0.00	0.05
Benzaldehyde	Sweet, candy, wood	5	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Phenylacetaldehyde	Roses	1	0.02	0.01	0.01	0.00	0.02	0.03	0.04
Acetone	Butter	150	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
γ-Butyrolactone	Coconut	35	0.17	0.16	0.14	0.10	0.30	0.18	0.41

**3.4. Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential  
Fermentations Made by Native Strains from D.O.  
“Vinos de Madrid” Using Real-Time Quantitative PCR**

García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J. M.  
y Arroyo, T.

Publicado en:

Frontiers in Microbiology, 2017, 8:2520.

doi: 10.3389/fmicb.2017.02520

#### **Monitorización de levaduras en fermentaciones mixtas o secuenciales elaboradas con cepas nativas de la D.O. “Vinos de Madrid” usando PCR cuantitativa en tiempo real**

##### **RESUMEN**

Hay una tendencia creciente hacia el entendimiento del impacto de las levaduras no-*Saccharomyces* en el proceso de elaboración del vino. Aunque *Saccharomyces cerevisiae* es la especie predominante a final de fermentación, se ha reconocido que la presencia de especies de no-*Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica puede producir una mejora en la calidad y complejidad de los vinos finales. Un trabajo previo fue desarrollado a escala de laboratorio para la selección de las mejores combinaciones entre *S. cerevisiae* y cinco no-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Lachancea thermotolerans*), levaduras nativas de la D.O. “Vinos de Madrid”. Las mejores estrategias de inoculación entre las cepas *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* fueron elegidas para analizar, mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) junto con el diseño de cebadores específicos, la dinámica de las poblaciones inoculadas a lo largo de todo el proceso de fermentación a escala piloto usando la variedad de uva blanca Malvar. La eficiencia del sistema de qPCR se verificó, independientemente de la matriz de las muestras, hallando las especies de levaduras inoculadas a lo largo de la fermentación. Finalmente, hemos podido validar el efecto positivo de los co-cultivos seleccionados en la calidad del vino Malvar, destacando los cultivos secuenciales de *T. delbrueckii* CLI 918/*S. cerevisiae* CLI 889 y *C. stellata* CLI 920/*S. cerevisiae* CLI 889, y los cultivos mixto y secuencial de *L. thermotolerans* 9-6C/*S. cerevisiae* CLI 889.

**Contribución personal al manuscrito:** Yo he participado en el diseño y elaboración de los experimentos, en el análisis y discusión de los resultados, así como, en la escritura del manuscrito.



# Yeast Monitoring of Wine Mixed or Sequential Fermentations Made by Native Strains from D.O. “Vinos de Madrid” Using Real-Time Quantitative PCR

Margarita García<sup>1</sup>, Braulio Esteve-Zarzoso<sup>2\*</sup>, Julia Crespo<sup>1</sup>, Juan M. Cabellos<sup>1</sup> and Teresa Arroyo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Pedro Miguel Izquierdo Cañas,  
Instituto de la Vid y el Vino  
de Castilla-La Mancha, Spain

### Reviewed by:

Silvana Vero,  
University of the Republic, Uruguay  
Esther Rodríguez,  
University of Cádiz, Spain

### \*Correspondence:

Braulio Esteve-Zarzoso  
braulio.esteve@urv.cat  
Teresa Arroyo  
teresa.arroyo@madrid.org

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 31 July 2017

Accepted: 04 December 2017

Published: 20 December 2017

### Citation:

García M, Esteve-Zarzoso B,  
Crespo J, Cabellos JM and Arroyo T  
(2017) Yeast Monitoring of Wine  
Mixed or Sequential Fermentations  
Made by Native Strains from D.O.  
“Vinos de Madrid” Using Real-Time  
Quantitative PCR.  
Front. Microbiol. 8:2520.  
doi: 10.3389/fmicb.2017.02520

There is an increasing trend toward understanding the impact of non-*Saccharomyces* yeasts on the winemaking process. Although *Saccharomyces cerevisiae* is the predominant species at the end of fermentation, it has been recognized that the presence of non-*Saccharomyces* species during alcoholic fermentation can produce an improvement in the quality and complexity of the final wines. A previous work was developed for selecting the best combinations between *S. cerevisiae* and five non-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Lachancea thermotolerans*) native yeast strains from D.O. “Vinos de Madrid” at the laboratory scale. The best inoculation strategies between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains were chosen to analyze, by real-time quantitative PCR (qPCR) combined with the use of specific primers, the dynamics of inoculated populations throughout the fermentation process at the pilot scale using the Malvar white grape variety. The efficiency of the qPCR system was verified independently of the samples matrix, founding the inoculated yeast species throughout alcoholic fermentation. Finally, we can validate the positive effect of selected co-cultures in the Malvar wine quality, highlighting the sequential cultures of *T. delbrueckii* CLI 918/*S. cerevisiae* CLI 889 and *C. stellata* CLI 920/*S. cerevisiae* CLI 889 and, mixed and sequential cultures of *L. thermotolerans* 9-6C combined with *S. cerevisiae* CLI 889.

**Keywords:** qPCR, native yeast, non-*Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, multi-starter fermentation, Malvar wine, sensorial analysis

## INTRODUCTION

Alcoholic fermentation is a complex ecological and biochemical process where a succession of yeasts of several genera and species are able to convert must sugars into ethanol and carbon dioxide, as well as into important secondary metabolites (Barata et al., 2012; Sun et al., 2014; Albergaria and Arneborg, 2016). Even though *Saccharomyces* species are present at a low frequency on the surface of healthy grapes, *Saccharomyces cerevisiae* is considered the primary microorganism in the fermentation process and it is widely used in oenology (Martini et al., 1996; Fleet, 2003). However,

during the last decade, non-*Saccharomyces* yeasts species have been proposed for winemaking as they could contribute to the improvement of wine quality (Ciani et al., 2014; Wang et al., 2015; Masneuf-Pomarede et al., 2016; Puertas et al., 2016). Thus, a new trend has emerged in winemaking using starter cultures composed by non-*Saccharomyces* yeasts, together with *S. cerevisiae* or for sequential fermentation with *S. cerevisiae*.

Molecular methods are showing useful results for detection and faster identification of microorganisms throughout the wine elaboration process (Ivey and Phister, 2011). Classical microbiological methods involving isolation coupled with the enumeration of microbes by plating can lead to misinterpretation of the real number of microorganisms since these methods fail to detect viable but non-culturable (VBNC) organisms (Divol and Lonvaud-Funel, 2005; Quirós et al., 2009; Salma et al., 2013; Wang et al., 2016) and minor populations present are difficult to detect on plates (Cocolin et al., 2013; David et al., 2014). Instead, molecular techniques, generally named culture-independent methods, are used for the identification of microorganism directly in the system through the study of their DNA or RNA without the need for isolation and cultivation, reducing detection time (Andorrà et al., 2008). Real-time quantitative PCR (qPCR) has been widely used in wine for microorganism detection during wine elaboration (Rawsthorne and Phister, 2006; Andorrà et al., 2008, 2010; Tofalo et al., 2012; Wang et al., 2014), providing significant advantages as the low detection level, the speed by which assays are performed, and the ability to quantify yeasts present following alcoholic fermentation.

In a previous work of García et al. (2017), small-scale fermentations were elaborated to study the oenological characterization of five non-*Saccharomyces* native yeast species under several co-culture conditions in combination with selected strain of *S. cerevisiae* CLI 889 to improve the organoleptic properties of the regional Malvar wines. There, the best inoculation process was selected depending on the non-*Saccharomyces* strain inoculated. Preferred sequential inoculations were elaborated with *S. cerevisiae* CLI 889 in combination with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 that produced wines with a higher fruity and floral aroma and lower ethanol content; with *Candida stellata* CLI 920 that increased the aroma complexity and glycerol content; and, with *Lachancea thermotolerans* 9-6C, produced an increase in acidity and floral and ripe fruit aroma. In the case of *Schizosaccharomyces pombe*, sequential fermentation was selected according to its fruity aroma score obtained after tasting. However, mixed cultures of *S. cerevisiae* with *Metschnikowia pulcherrima* CLI 457 and *L. thermotolerans* 9-6C was chosen due to a lower volatile acidity observed in final wines. Moreover, an increase of glycerol and ripe fruit aroma in the case of *M. pulcherrima* was observed, and for *L. thermotolerans* mixed culture the freshness, citric aroma, and full body were the main aspects to verify at the pilot scale.

Regarding these results, the aim of this work is to study yeast population evolution using real-time PCR during pilot winemaking trials under the best inoculation

strategies. Moreover, validation of their positive effect on wine fermentation and wine quality was observed in the previous laboratory scale study (García et al., 2017) using sensory analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast Strains

The non-*Saccharomyces* strains used in this study are *T. delbrueckii* CLI 918, *S. pombe* CLI 1079, *C. stellata* CLI 920, *M. pulcherrima* CLI 457 and *L. thermotolerans* 9-6C, and *S. cerevisiae* CLI 889 strain were previously isolated on the Madrid winegrowing region and selected and characterized in our laboratories based on some established and desirable oenological criteria (Arroyo, 2000; Cordero-Bueso et al., 2013, 2016).

### Wine Fermentation and Sampling

The pilot winemaking (stainless steel tanks with 16 L of must) was performed at IMIDRA's experimental cellar is located in the Madrid winegrowing region, Spain (40°31' N, 3°17' W and 610 m altitude). Grapes were collected from Malvar (*Vitis vinifera* cv.) white grape variety to elaborate the wines, which were obtained in accordance with the cellar standard practices for harvest. Musts were racked, homogenized, and dislodged statically at 4°C to clarify and be sulfited (50 ppm). Musts obtained from two different vineyards, Must I and Must II, showed 1095 and 1099 g L<sup>-1</sup> of density, pH values were 3.05 and 3.15, titratable acidity (expressed as g L<sup>-1</sup> of tartaric acid) was 5.7 and 4.8, and yeast assimilable nitrogen (YAN) values were 218 and 100 mgN L<sup>-1</sup>, respectively.

Triplicate fermentations were carried out in stainless steel tanks with 16 L of fresh Malvar must at a controlled temperature of 18°C without agitation and, the tanks were locked to maintain anaerobiosis throughout alcoholic fermentation (CO<sub>2</sub> was released through a sterile Müller valve with 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Tanks were inoculated with a *pied de cuve* until a concentration of 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of each yeast strain. These inocula were achieved by an overnight culture of the different yeast strains in sterile must of the same variety prepared away from the cellar. Preselected combinations between *S. cerevisiae* CLI 889 and the different non-*Saccharomyces* species were the best results in García et al. (2017). We named mixed fermentation when both strains are inoculated at the same time, and in sequential fermentation, the non-*Saccharomyces* culture was inoculated at first and the addition of *S. cerevisiae* takes place when the wine contains 5% alcohol (v/v). The trials tested in must I, were: sequential culture of *T. delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889 strains (s-Td/ScI); mixed culture of *M. pulcherrima* CLI 457 and *S. cerevisiae* CLI 889 strains (m-Mp/ScI); and pure culture of *S. cerevisiae* CLI 889 (p-ScI), culture considered as control. The combinations in Malvar must II were: sequential culture of *S. pombe* CLI 1079 and *S. cerevisiae* CLI 889 (s-Sp/ScII); sequential culture of *C. stellata* CLI 920 and *S. cerevisiae* CLI 889 (s-Cs/ScII); mixed culture of *L. thermotolerans* 9-6C and *S. cerevisiae* CLI 889 (m-Lt/ScII);



sequential culture of *L. thermotolerans* 9-6C and *S. cerevisiae* CLI 889 (s-Lt/ScII); and pure culture of *S. cerevisiae* CLI 889 (p-ScII) as a control.

The fermentation process was monitored daily through density, °Baumé, and temperature measurements until constant density (lower than 1000 g L<sup>-1</sup>). Samples were taken for every tank during the vinification process. Samples (1 mL) for qPCR analyses were centrifuged and pellets were immediately cryopreserved. For total yeast counts, samples were spread on yeast extract peptone dextrose (YPD) plates and on lysine agar medium [0.25% L-Lysine monohydrochloride (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, United States), 1.17% yeast carbon base (Difco, Detroit, MI, United States), and 2% agar, w/v], a selective medium for the differentiation of non-*Saccharomyces* yeast populations which does not support the growth of *S. cerevisiae* (Walters and

Thiselton, 1953). One week after fermentation finished, the wines were bottled after racking and adding 50 ppm SO<sub>2</sub>.

### Oligonucleotides

Specific-species primers were designed in this work from conserved sequences of the variable D1/D2 domains of the 26S rDNA gene. Generated sequences were aligned with sequences of strains of the same species (Table 1) available at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI)<sup>1</sup> using Clustal W multiple-sequence alignment (Thompson et al., 1994). The primer design was performed using the Primer3Plus program<sup>2</sup>. Furthermore, the properties of each primer were verified by

<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<sup>2</sup><http://www.primer3plus.com>

**TABLE 1** | List of the accession numbers from GenBank of the sequences used for primer design.

Yeast species	Strain/isolate number	Accession number	Primer <sup>b</sup>					
			SC	Tods	SP1	CS1	MP2	LTH2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CLI 889 <sup>a</sup>	MF001376	+	–	–	–	–	–
	GS1-3	FJ912839						
	N9323	EU268657						
	cs56	JX129910						
	CBS 2811	KY109393						
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CLI 918 <sup>a</sup>	JQ707782	–	+	–	–	–	–
	t15-CTR-7	HQ845012						
	BBMV3FA5	KF735113						
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CLI 1079 <sup>a</sup>	MF001377	–	–	+	–	–	–
	CLI 1085	JQ804983						
	ATCC 16979	KF278469						
	NCYC 3748	JF951752						
<i>Candida stellata</i>	CLI 920 <sup>a</sup>	JQ707776	–	–	–	+	–	–
	CBS 2843	EF452199						
	NX8A	EF564405						
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CLI 457 <sup>a</sup>	MF001378	–	–	–	–	+	–
	cs51	JX129913						
	N213	EU268661						
<i>Lachancea thermotolerans</i>	9-6C <sup>a</sup>	MF001379	–	–	–	–	–	+
	CLI 1219	JQ707778						
	cs240	JX129903						
<i>Pickia kudriavzevii</i>	CLI 1216	JQ707777						
	cs280	JX129897						
	cs336	JX129895						
<i>Candida zemplinina</i>	cs271	JX129898						
<i>Candida apicola</i>	cs15	JX129912						
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	cs247	JX129900						
	B-1-7	FJ842088						
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	A11-1-5	EU386752						
	CEC 13A2	KR069091						
<i>Issatchenkia terricola</i>	cs212	JX129906						
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	N2314	EU268642						
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CECT 10425	KX539237						

Species and strain designations were included. <sup>a</sup>These sequences belong to the yeast strains used in this work. <sup>b</sup>Results by conventional PCR with primers used in this work (+, presence of PCR product; –, absence of PCR product).

**TABLE 2** | Primer sequences used for real-time quantitative PCR analysis.

Yeast species	Primer name	Sequence 5'–3'	Reference
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC1	GAAAACTCCACAGTGTGTG	Zott et al., 2010
	SC2	GCTTAAGTGC GCGGTCTTG	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Tods L2	CAAAGTCATCCAAGCCAGC	Zott et al., 2010
	Tods R2	TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SP1-F	AGTGAAGCGGGAAAAGCTCA	This work
	SP1-R	ATCGACCAAAGACGGGGTTC	
<i>Candida stellata</i>	CS1-F	AGTAACGGCGAGTGAACAGG	This work
	CS1-R	GGCTATCACCCCTCTATGGCG	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MP2-F	AGACACTTAAC TGGGCCAGC	This work
	MP2-R	GGGGTGGTGTGGAAGTAAGG	
<i>Lachancea thermotolerans</i>	LTH2-F	CGCTCCTTGTGGGTGGGGAT	This work
	LTH2-R	CTGGGCTATAACGCTTCTCC	

The microorganisms' targets for each couple of primers are included.

NIST Primer Tools<sup>3</sup>. Primers used in this study (Table 2) were synthesized by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany). Moreover, conventional and real-time PCR were carried out using a range of yeast species to verify the specificity of each primer set.

### DNA Extraction and Real-Time PCR Assays

Yeast cell pellets were washed with sterile distilled water, and the pellets were resuspended in 700  $\mu$ L of AP1 buffer (DNeasy Plant Mini Kit; QIAGEN, Valencia, CA, United States) and transferred in a 2-mL microcentrifuge tube containing 1 g of 0.5 mm-diameter glass beads. The tubes were shaken in a mixer mill (Retsch GmbH, Haan, Germany) for 3 min at the maximum rate and then centrifuged at 10,000 rpm for 1 min. Then, the supernatant was transferred to a sterile tube and purified using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions.

qPCR was performed on an Applied Biosystems Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, United States). PCR amplification was conducted in optical-grade 96-well plates (Applied Biosystems) and each 25  $\mu$ L reaction mixture containing 5  $\mu$ L of DNA, 0.7  $\mu$ M of each respective primer, and 12.5  $\mu$ L of SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Each reaction was made in triplicate. The reaction conditions were an initial step at 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 72°C for 30 s. The  $C_T$  was determined automatically by the instrument. The coefficients of efficiency (E) were calculated using the formula  $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$  (Higuchi et al., 1993).

### Standard Curves

Standard curves for each yeast strain were created by plotting the cycle threshold ( $C_T$ ) values of the qPCR performed with dilution series of yeast cells ( $10^7$  to  $10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) against the log input cell  $\text{mL}^{-1}$  (ABI PRISM 7500 sequence detection system, Applied Biosystems). Standard curves were created for the six yeast strains used in this work.

<sup>3</sup><https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>

### Artificial Contamination of Wines

Commercial Tempranillo red wine and Malvar white wine, previously sterilized by filtration, and YPD liquid medium were artificially contaminated with *T. delbrueckii* CLI 918, at known concentrations ( $10^6$  to  $10^2$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ). After incubation of 24 h at 20°C, DNA was isolated as indicated before for qPCR analysis. Standard curves for quantification of samples and determination of amplification efficiency were constructed. These dilutions were also plated on YPD agar and incubated 1 week at 28°C to obtain the number of CFU per milliliter using an easySpiral® plater (Interscience, St. Nom, France).

### Study of *Saccharomyces cerevisiae* at the Strain Level

Microsatellite multiplex PCR analysis was used to check the presence of *S. cerevisiae* CLI 889 in the different types of elaboration, using the highly polymorphic loci SC8132X, YOR267C, and SCPTS7 (Vaudano and Garcia-Moruno, 2008). The analysis was performed according to Cordero-Bueso et al. (2011) and Tello et al. (2012).

### Analytical Determination

Oenological parameters as alcohol degree, pH, volatile acidity, total acidity, reducing sugars, glycerol, malic acid, and lactic acid were measured by Fourier transform infrared spectroscopy in the laboratories of Liec Agroalimentaria S.L. (Manzanares, Spain). An accredited laboratory for physico-chemical analysis in wines to conform to UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 rules. YAN was determined in must by the formol titration method (Gump et al., 2002).

Quantification of major volatile compounds was carried out in a GC Agilent 6850 with a FID detector equipped with a column DB-Wax (60 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.5  $\mu$ m film thickness) from J&W Scientific (Folsom, CA, United States). Analyses were done according to Gil et al. (2006) and Balboa-Lagunero et al. (2013).

### Sensorial Analysis

The final wines were subjected to two sensory analyses, triangle tests (ISO 4120:2007) and descriptive analysis by a trained

panel of seven skilled judges from the IMIDRA Institute. Using triangle tests, the judges determine if a sensory difference exists between the wines tested. Sensory descriptive analysis was based on the description of attributes of the wines through 15 aroma and taste descriptors, and the panelists were asked about their preferences. These attributes were estimated on a scale from 1 (low intensity) to 10 (high intensity) and total scores were obtained as the mean and standard deviation of seven evaluations (Arroyo et al., 2009; Balboa-Lagunero et al., 2013).

### Statistical Analysis

Analysis of variance was carried out by an ANOVA Tukey test to determine significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) between the samples with their respective fermentation control. PCA analysis was performed to identify the most influential oenological parameters and volatile compounds in the different types of cultures. The data were analyzed with SPSS Statistics 21.0 Software for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, United States).

## RESULTS

### Primer Design, Specificity and Sensitivity of qPCR

Primers proposed in this work were designed on the variable D1/D2 domains of 26S rDNA gene, amplifying products between 100 and 150 bp in length. Primers for the quantification of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* strains were designed by Zott et al. (2010) from the region of internal transcribed spacers (ITSs) of the ribosomal DNA region. The other primers used were designed for this work according to those described in the material and methods sections. Sequences for all primers are listed on the Table 2.

Each pair of primers exhibited *in silico* specific homology to only species for which were designed. Additionally, conventional PCR was performed using purified DNA from the yeast species used in this study and different strains belonging to the yeasts species *Candida vini*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Priceomyces carsonii*, and *Lachancea fermentati*, the most usual species isolated during spontaneous fermentation of Malvar must in the experimental cellar of IMIDRA (Cordero-Bueso et al., 2013), which are also included in the IMIDRA Institute Collection. Amplifications were observed only for those species which the primers that were specifically developed (Table 1).

To determine the standard curves qPCR, YPD cultures of each strain containing  $10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  were serially diluted 10-fold until  $10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  and DNA were extracted from 1 ml of each dilution. The DNA was then amplified by qPCR and standard curves were constructed. The slope, intersection, correlation coefficient ( $R^2$ ), and efficiency of the standard curves obtained are shown in Table 3. The assays were linear over five orders of magnitude and, the detection limit for all yeast species was  $10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

### Quantification in Artificially Contaminated Wines

To study the influence of the wine matrix on the efficiency of the real-time PCR system, standard curves using artificial contaminated wines with *T. delbrueckii* CLI 918 strain were obtained from white (Malvar) and red (Tempranillo) wines, and YPD (control) cultures (Figure 1). *T. delbrueckii* CLI 918 strain was used to study this influence. Detection limits for all curves were  $10^2$  cells  $\text{mL}^{-1}$  being linear over five orders of magnitude. The correlation coefficients, slopes, and efficiencies of the amplification of standard curves are shown in Figure 1. It could be possible to observe that the efficiency of qPCR in red wine is lower than white wine and YPD medium, however the differences observed were not statistically significant ( $p < 0.05$ ). This type of analysis was also done for other yeast species used in this study (data not shown) and the results agreed with the *T. delbrueckii* trial.

### Yeast Inoculated Population Analysis by qPCR during Alcoholic Fermentation

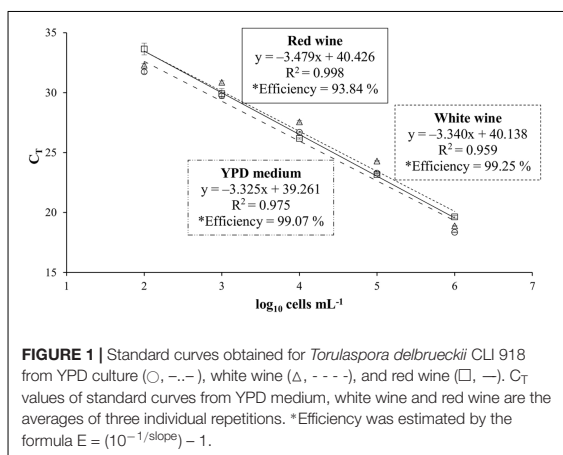
qPCR analysis was used to analyze the dynamics of five non-*Saccharomyces* yeasts inoculated, revealing that they were present throughout the alcoholic fermentation. A culture-dependent technique on YPD plates were used to follow the evolution of total cultivable yeasts (Figure 2).

Pure cultures of *S. cerevisiae* CLI 889 (p-ScI and p-ScII) used as controls in the fermentations with must I and must II presented different population dynamics. The control p-ScI slowly started to ferment, achieving the highest population at day 9, its fermentation finished with a population of  $2.5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  after 32 days (Figure 2A). Instead, p-ScII culture reached the greatest population on the second day of fermentation, finishing with  $2.7 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$  after 40 days (Figure 2D). The amount of sugar daily transformed in these pure cultures when 50% of the sugar content had been consumed ( $V_{50}$ ) was higher in p-ScII ( $V_{50}$ : 16.23) than p-ScI ( $V_{50}$ : 13.30); finally, the p-ScI culture ended the fermentation with 9.86 g  $\text{L}^{-1}$  of reducing sugars and 13.5% (v/v) of ethanol, while p-ScII was able to consume the sugars present in the grape must and finished with 13.0% (v/v) of ethanol (Supplementary Table S1).

TABLE 3 | Standard curves performed for each yeast species.

Yeast	Slope	Intersection	$R^2$	Efficiency (%)
<i>S. cerevisiae</i>	$-3.17 \pm 0.04$	$37.20 \pm 0.26$	$0.997 \pm 0.00$	$106.7 \pm 1.97$
<i>T. delbrueckii</i>	$-3.27 \pm 0.13$	$38.15 \pm 0.61$	$0.996 \pm 0.00$	$102.2 \pm 5.62$
<i>S. pombe</i>	$-3.12 \pm 0.05$	$37.58 \pm 0.45$	$0.999 \pm 0.00$	$108.9 \pm 1.06$
<i>C. stellata</i>	$-3.19 \pm 0.21$	$37.53 \pm 0.81$	$0.998 \pm 0.00$	$105.9 \pm 8.72$
<i>M. pulcherrima</i>	$-3.29 \pm 0.01$	$39.06 \pm 0.04$	$0.992 \pm 0.00$	$101.3 \pm 0.39$
<i>L. thermotolerans</i>	$-3.11 \pm 0.18$	$37.97 \pm 0.41$	$0.993 \pm 0.00$	$109.4 \pm 3.29$

The slope, intersection, correlation coefficient ( $R^2$ ), and efficiency of standard curves of *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *S. pombe*, *C. stellata*, *M. pulcherrima*, and *L. thermotolerans* were determined by qPCR analysis. Mean  $\pm$  standard deviation of triplicate qPCR amplifications are shown. Efficiency was estimated by the formula  $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$ .



Regarding to mixed cultures (Figure 2C for *M. pulcherrima* and 2G for *L. thermotolerans*), on Figure 2C it could be possible to observe a small increase of *S. cerevisiae* population until day 9, after that a decrease and a maintenance in its population were observed. In contrast, *M. pulcherrima* population decreased from the beginning of the fermentation, finishing with three orders of magnitude lower than its control (p-ScI) at the end of fermentation after 32 days of vinification. The density values decreased to day 16, when the slow decrease of density coincided in time with the population stabilization of *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. In the case of *L. thermotolerans* mixed fermentation (Figure 2G), there was an increase of this yeast population at the beginning, and after 6 days, a decrease was observed. In the whole fermentation process, the *S. cerevisiae* population was higher than *L. thermotolerans* population. The growth profile of *S. cerevisiae* in this mixed culture (Figure 2G) shows a high similarity with its control p-ScII (Figure 2D). Both cases on mixed fermentations, the fermentation takes the same time to reduce the density than the controls, and the residual sugars in final wines were also similar to their respective controls.

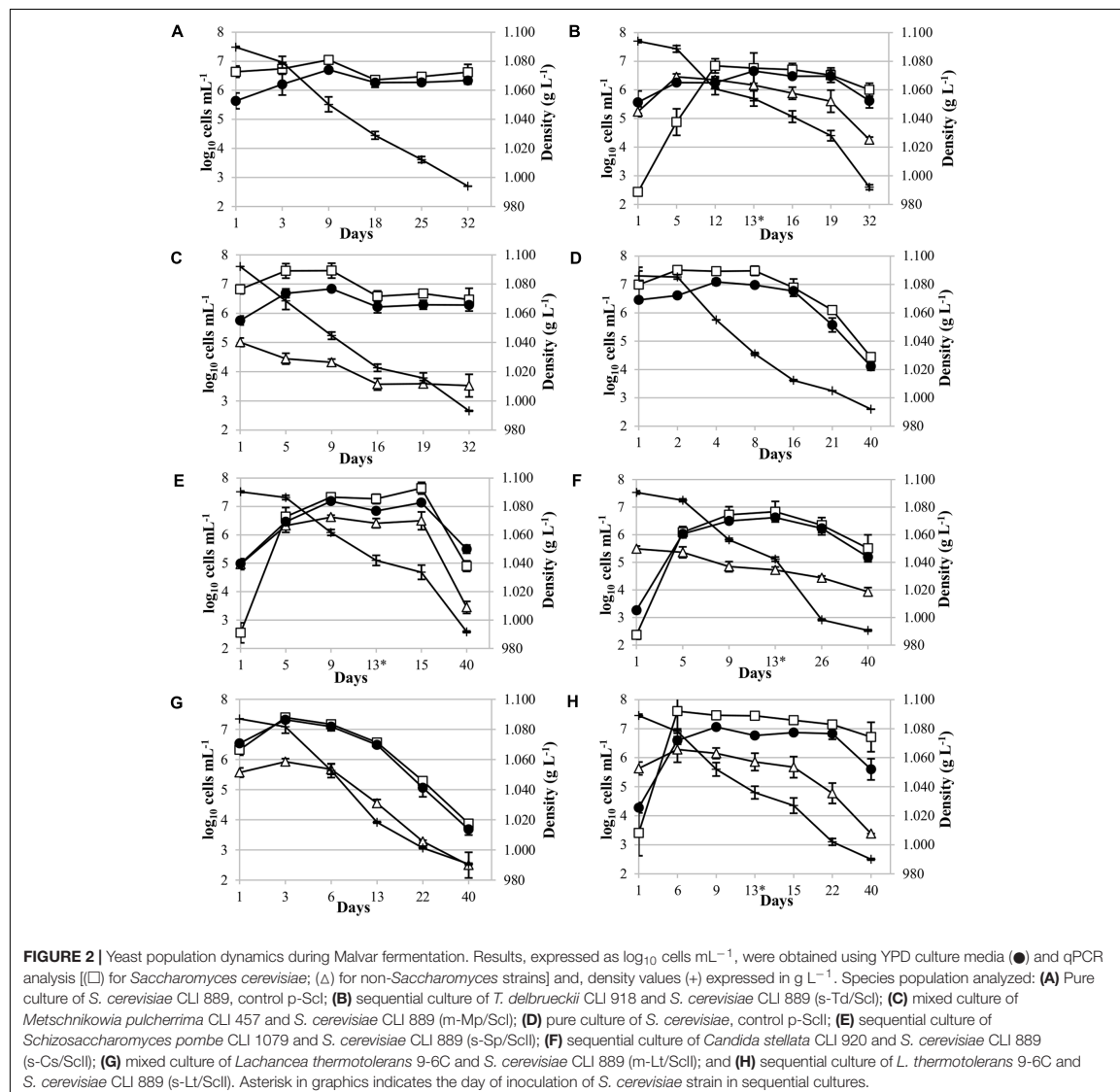
For sequential cultures, *S. cerevisiae* CLI 889 strain was inoculated at day 13 (represented by the asterisk in the graphics). It is worth noting that the native *S. cerevisiae* population increased between four and five orders of magnitude during the beginning of sequential fermentations, however, an improvement of the fermentation rate has been observed after *S. cerevisiae* inoculation (Figures 2B,E,F,H). After microsatellites multiplex PCR analysis to check the presence of *S. cerevisiae* CLI 889 strain from its day of inoculation (day 13) over another *S. cerevisiae* presented in the cellar environment, we found that the microsatellite pattern of the strain inoculated was exhibited by all the isolates analyzed. In Figure 2B it is possible to observe that the highest concentration of *T. delbrueckii* CLI 918 was achieved after 5 days, remaining at this level during the alcoholic fermentation, and finishing with the greatest final concentration in comparison with the other non-*Saccharomyces* tested in the sequential cultures. Although this fermentation

takes the same length that its control, they need 32 days to reduce the density to lower than  $1000 \text{ g L}^{-1}$ , the amount of residual sugars is different, showing lower concentrations for the sequential inoculation than its control (Supplementary Table S1). In the *S. pombe*/*S. cerevisiae* sequential culture (Figure 2E), an increment of *S. cerevisiae* population after *S. cerevisiae* CLI 889 inoculation can be observed. The *S. pombe* CLI 1079 population is maintained high during the fermentation even after *S. cerevisiae* is added. At the end of vinification, this non-*Saccharomyces* strain finished with approximately one order of magnitude less than *S. cerevisiae* population. *C. stellata* CLI 920 which seemed to be less competitive in this type of inoculation, presented a number of cells two orders of magnitude lower than *S. cerevisiae* from the day 9 (Figure 2F). This strain in sequential fermentation (Figure 2F) presented its higher counts after the first 24 h, then started to decrease until the end of fermentation (day 40). In this case, however, the inoculation of the *S. cerevisiae* strain produces an improvement of the fermentation rate, showing on Figure 2F a high reduction on the density, but the amount of *S. cerevisiae* was not changed. *L. thermotolerans* in sequential culture (Figure 2H) remained at high and relatively stable cell levels until day 15 when its population decreased more quickly, ending with three orders of magnitude less than *S. cerevisiae* at the end of fermentation, probably due to *S. cerevisiae* CLI 889 inoculation at day 13, which also produced a decrease of density.

### Analytical Determination of Wines

The main oenological parameters analyzed are listed in Supplementary Table S1, which shows that sequential fermentations produced wines so different to their control. Most of the cases the differences involve three or more parameters, while on mixed fermentations the differences with respect to the controls are reduced to a few parameters. Although the differences observed in the ethanol produced among the different fermentations exhibited a significant difference, these differences are lower than 0.5% (v/v), having no consideration for establish differences due to this parameter. However, the differences with respect to the control can be observed using other parameters, such as glycerol or malic acid. Volatile compounds analyzed (Supplementary Table S2) do not show significant differences on single compounds, but they have been observed when clusters of compounds have been conducted.

To confirm the differences among pure cultures of *S. cerevisiae* (p-ScI and p-ScII, considered as controls) and co-culture-fermented wines, a principal component analysis (PCA) was elaborated (Figure 3) from all data obtained from the analysis of oenological parameters and volatile compounds (Supplementary Tables S1, S2). The first two principal components, PC1 and PC2 accounted for 72.23% of total variance (Figure 3). PC2, which is mostly formed by volatile compounds (the impact of each parameter on the component is indicated in brackets) as ethyl isovalerate (0.971), ethyl-3-hydroxybutyrate (0.949), 1-butanol (0.914), isoamyl acetate (0.750), ethyl butyrate (0.614), and ethyl hexanoate (0.606), allowed us to differentiate the different types of culture with non-*Saccharomyces* species in combination with the *S. cerevisiae* strain, while the main parameters for PC1 were hexanoic acid (0.989), octanoic acid (0.982), 1-hexanol

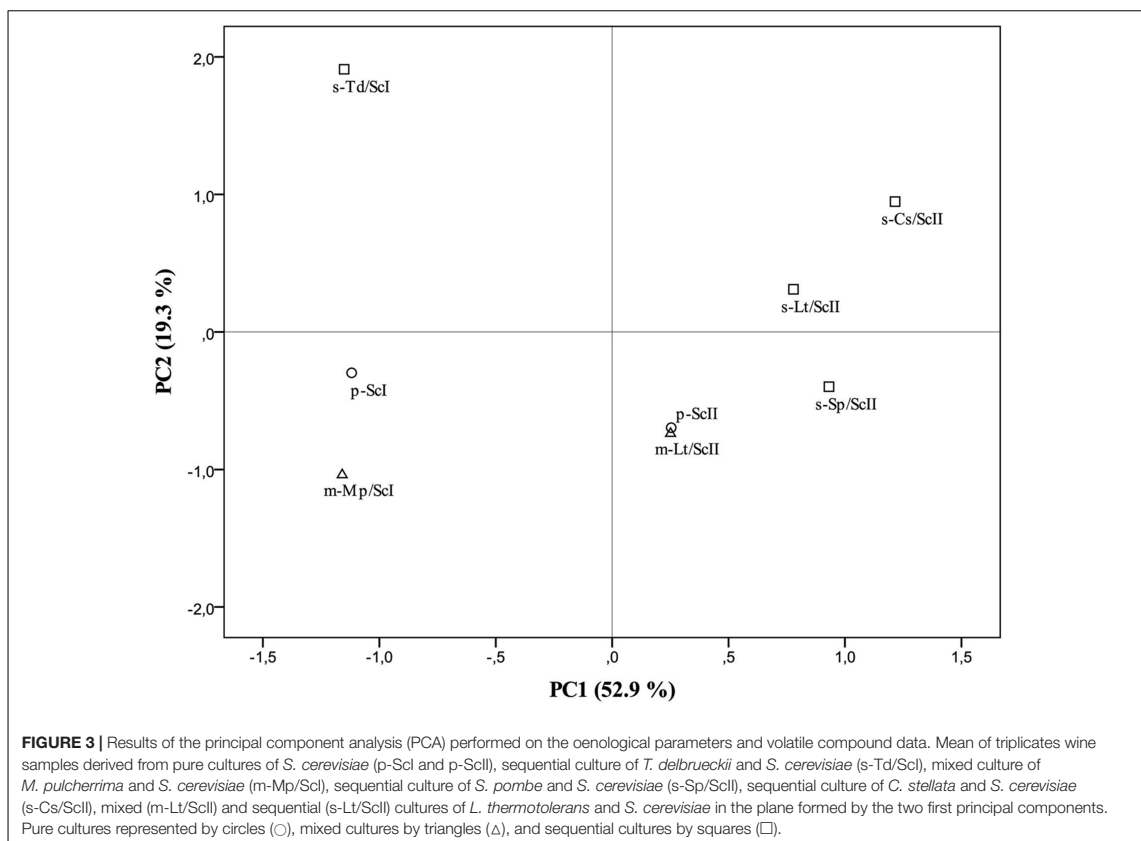


(0.979), isovaleric acid (0.965), diacetyl (0.961), isoamyl alcohol (0.929),  $\beta$ -phenylethyl alcohol (0.927), isobutanol (0.901), and pH (0.876), differentiating the cultures elaborated with Malvar must I and must II. This PCA confirmed the evidence given by the analytical assays, making it possible to confirm a higher similarity between mixed cultures and their respective controls in contrast with the greater differences found in sequential cultures (Figure 3).

### Sensory Profile of the Produced Wines

Wines elaborated were tested by skilled judges from the IMIDRA Institute as the sensorial panel. For fermentations

conducted with must I, all panelists were able to distinguish sequential culture of *T. delbrueckii* from the control with a 0.1% significance level by triangle tests. In the case of mixed culture of *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae*, tasters differentiated this type of inoculation with respect to the control with a 5% significance level (data not shown). Most panelists considered the sequential culture of *T. delbrueckii* as the best one wine due to its higher aroma intensity, overall quality, and its fruity and floral aroma; also, they denoted its bitter taste (Figure 4A). The mixed culture of *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* was described by tasters for its acid and alcoholic character (Figure 4A), but also residual sugars in this fermentation (Supplementary Table S1) were detected. The



aroma was described by tasters as ripe fruit and banana but, in general, this wine was described as not intense and its lower concentration of volatile compounds compared to the rest of wines can also be seen (Supplementary Table S2).

Furthermore, on fermentations with must II, tasters were able to differentiate the sequential culture of *S. pombe*/*S. cerevisiae* (s-Sp/ScII), the sequential culture of *C. stellata*/*S. cerevisiae* (s-Cs/ScII), and the mixed culture of *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* (s-Lt/ScII) from the control with a 5% significance level by triangle tests; and, the sequential culture of *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* was differentiated with a 1% significance level through the same tests (data not shown). However, there was no clear preference on sensorial analysis; three of the seven panelists preferred the sequential culture of *C. stellata*/*S. cerevisiae*, and two of them chose the mixed culture of *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae*, while the other two preferred the sequential culture of *L. thermotolerans* by descriptive analysis.

Sequential culture of *C. stellata* was described by tasters as a wine with a pleasant fruity (green apple, grapefruit) and floral aroma; it was denoted as fresh and full-bodied on the palate (Figure 4B).

*Lachancea thermotolerans* in sequential and mixed cultures were well-accepted by tasters (Figure 4B). The mixed culture

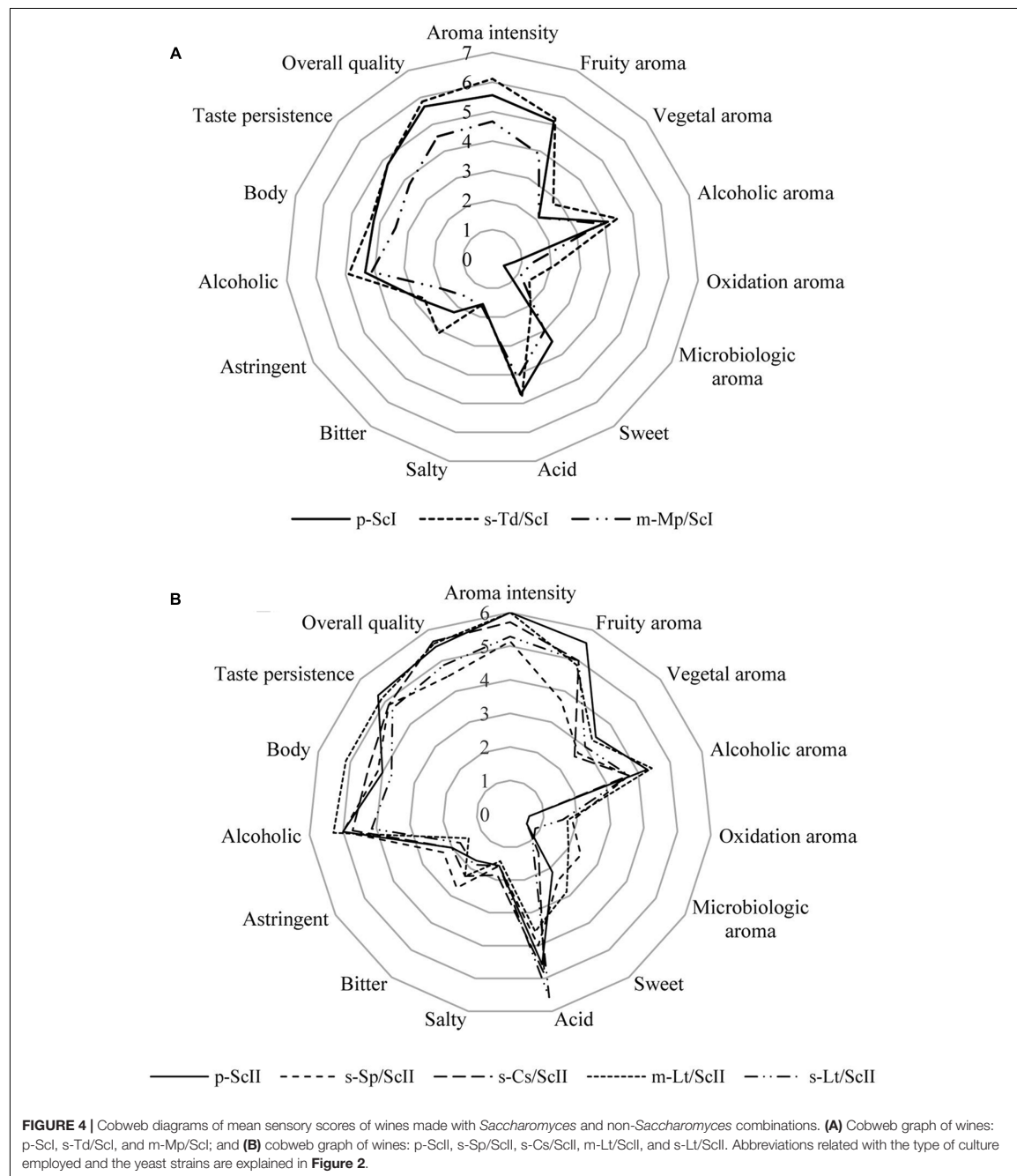
was noted for an intense flavor, balanced acidity, and alcohol with slight sweetness and full body. Its aroma was described as lemon, apple, and nut notes and high aroma intensity. Instead, the sequential culture of *L. thermotolerans* presented the highest acidity of all wines (Figure 4B) due to its higher lactic acid content (Supplementary Table S1). Tasters highlighted its fruity (ripe fruit) and floral aroma and freshness on the palate.

Finally, tasters noted that sequential culture of *S. pombe*/*S. cerevisiae* did not improve the organoleptic characteristics to Malvar wines (Figure 4B). This wine was described as acid and bitter, low aromatic intensity with citric notes probably due to ethyl octanoate, and ethyl hexanoate volatile compounds (Supplementary Table S2). Additionally, microbiological aroma was detected by tasters in this culture.

## DISCUSSION

In this study, we quantified the evolution of inoculated non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* populations during alcoholic fermentation in different combinations between strains of different species in a natural must of a white grape Malvar variety. A rapid culture-independent qPCR method for detection





and enumeration of different yeasts was applied in Malvar wine fermentations. Four pairs of primers were designed in this work into the variable D1/D2 domains of the 26S ribosomal DNA gene to the strains *S. pombe* CLI 1079, *C. stellata* CLI

920, *M. pulcherrima* CLI 457, and *L. thermotolerans* 9-6C; this region has previously been used to develop qPCR methods for several yeasts (Andorrà et al., 2010; Albertin et al., 2014). Two other pair of primers were designed by Zott et al. (2010)



to the ITS region of rDNA, and this region is widely used in yeast species identification due to the high degree of interspecies sequence variations (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Schoch et al., 2012). These qPCR species-specific primers showed an excellent specificity with all wine yeasts tested and did not amplify other representative wine species. Moreover, standard curves elaborated with the different yeast strains presented high efficiencies, and good detection limits, we enumerated the concentration of  $10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , and the trials were linear over five orders of magnitude.

The *T. delbrueckii* CLI 918 strain has been utilized to study the matrix influence in the efficiency of qPCR system. Our results were able to show that the matrix of red wine influences on the PCR amplification or on the DNA extraction and purification, due presumably to its much higher proportion of polyphenols. It is known that wine is a complex matrix that presents various PCR inhibitors (Zoecklein et al., 1999; Phister and Mills, 2003), such as major compounds as polyphenols, tannins, and polysaccharides. The efficiency obtained on qPCR analysis from red wine is lower than from white wine and YPD medium, although these values are similar in all cases and without statistical significance. Some authors have reported problems of amplification with DNA isolated directly from wine (Phister and Mills, 2003; Martorell et al., 2005). The assay performed here helped to check that the wine matrix did not significantly influence in the efficiency of the qPCR analysis. According to our results the construction of standard curves in different matrices do not substantially modify the results, and any matrix can be used to quantify the yeast populations from wine fermentation.

It had long been considered that the non-*Saccharomyces* yeasts are present at the beginning of alcoholic fermentation, being replaced by *S. cerevisiae* which has a high capacity to take over the process. In this work, the dynamics of five non-*Saccharomyces* yeasts in co-inoculation with *S. cerevisiae* have been analyzed, revealing that these non-*Saccharomyces* species were present throughout the fermentation process. If they are present during fermentation we expected contribution to the chemical and sensory attributes of the final wines. However, even though these five non-*Saccharomyces* strains were present during fermentation, *S. cerevisiae* was the most abundant yeast under any of the co-cultures tested at the end of the fermentations. Different mechanisms have been described to explain the dominance of *S. cerevisiae* over other competitors during wine fermentation, i.e., cell-to-cell contact (Nissen et al., 2003); competition for nutrients (Taillandier et al., 2014; Kemsawasd et al., 2015b; Lleixà et al., 2016); secretion of toxic compounds (Pérez-Nevado et al., 2006; Branco et al., 2015; Ramírez et al., 2015; Wang et al., 2016), or changes in the medium (Goddard, 2008; Salvadó et al., 2011). These effects caused by *S. cerevisiae* metabolite production and changes in the medium could provide an explanation for the decrease of *M. pulcherrima* and *C. stellata* and the increase and persistence of *T. delbrueckii*, *S. pombe*, and *L. thermotolerans* belong to the fermentation, due to their higher fermentative power (García et al., 2017) in relation to the amount of alcohol produced by the yeast species (Lopes et al., 2006) and, therefore, related to their alcohol tolerance (Ciani et al., 2016). In the case of *L. thermotolerans*, the enhancement of total acidity produced

by this species can also influence in the growth of *S. cerevisiae* and other yeast species. However, the sensibility to these toxic compounds has been described as species- and strain-specific (Wang et al., 2016).

The multi-starter fermentations, combining both non-*Saccharomyces* yeasts and *S. cerevisiae* species able to complete the fermentation, are being studied in depth. All these yeast interaction studies have been increased to explain yeast–yeast interactions and their underlying mechanisms in the increasing use of controlled mixed cultures (Ciani et al., 2010; Ciani and Comitini, 2015). These studies have also been driven by the presence of viable and non-culturable microorganisms in wine samples (Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Divol and Lonvaud-Funel, 2005), and may have a false idea about the number of non-*Saccharomyces* species on microbiological methods based on plating (Serpaggi et al., 2012; Wang et al., 2016). In this study, the counts obtained by qPCR were contrasted with plating in YPD non-selective medium and LYS medium (data not shown), a selective medium for non-*Saccharomyces* yeasts. Generally, the yeast populations observed in LYS agar were higher than those obtained by qPCR. This greater growth on LYS medium, could be explained by the growth of other non-*Saccharomyces* yeasts present in the non-sterile Malvar must. This fact is in agreement with the results obtained by Phister and Mills (2003) in a *Dekkera bruxellensis* study.

Differences on the evolution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts have been observed depending on the type of inoculation. In the mixed culture of *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae*, the *M. pulcherrima* CLI 457 population started to decrease at 24 h in contrast with the increase of *S. cerevisiae* counts studied by qPCR. The antagonist effect of *M. pulcherrima* on several yeasts, including *S. cerevisiae*, which leads to delays in the fermentation, has been studied (Nguyen and Panon, 1998; Türkel and Ener, 2009). This phenomenon was due to a killer effect linked to pulcherrimin pigment produced by *M. pulcherrima* strains, Türkel and Ener (2009) found three strains of *M. pulcherrima* (UMY12, UMY14, and UMY15) that produce the same amount of the pigment pulcherrimin, but their antimicrobial activities showed important variations. Different distinct biotypes within the *M. pulcherrima* species with respect to the pulcherrimin production were identified by Pallmann et al. (2001). However, it has recently been described a difficulty in classifying *Metschnikowia fruticola* species since this species is not distinguishable from *Metschnikowia andauensis* and other species of the *M. pulcherrima* clade because of a possible heterogeneity of rRNA repeats (Cordero-Bueso et al., 2017). For this reason, we keep the original designation for this yeast strain, keeping the same yeast species name described on the published document by Arroyo et al. (2010). However, the variable D1/D2 domain of this strain was sequenced by MacroGen to be identified with 99% of sequence identity as *M. pulcherrima* and its sequence included in GenBank Database (accession number MF001378). Our results showed that the mixed culture of *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* finished with a high level of reducing sugars, in the same way that happened in co-cultures with these strains in laboratory scale fermentations (García et al., 2017), so it could be possible that the *M. pulcherrima* CLI 457

strain had a negative effect on the fermentative capacity of the *S. cerevisiae* CLI 889 strain. Instead, sequential fermentation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* finished with sugar values lower than  $4 \text{ g L}^{-1}$  as at laboratory level (García et al., 2017). Therefore, the fermentative capacity of *T. delbrueckii* in the first days seems to influence in the low sugar content of final wines, independently of the scale of fermentations, which is in agreement with results obtained by Puertas et al. (2016).

Some authors have reported the competition mechanisms between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* in mixed culture. Hansen et al. (2001) found that oxygen increases the competitiveness between *L. thermotolerans* CBS 2803 and *S. cerevisiae* Saint Georges S101 strains in mixed culture. In the same way, Nissen et al. (2004) concluded that *S. cerevisiae* Saint Georges S101 is able to grow and ferment more efficiently under oxygen-limited conditions present during wine fermentation in comparison with *L. thermotolerans* CBS 2803 and *T. delbrueckii* CBS 3085. Although other previous studies (Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003) showed that the death of *L. thermotolerans* in mixed culture with *S. cerevisiae* was induced by a cell-to-cell contact mediated mechanism with the same strains used by Nissen et al. (2004). Finally, Kemsawasd et al. (2015a) concluded that cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *L. thermotolerans* CBS 2803 in mixed fermentation with *S. cerevisiae* Saint Georges S101 strain. Our strain of *L. thermotolerans* in mixed culture showed a loss of viability most pronounced, although both populations decreased during fermentation process from day 3.

In sequential cultures, the *S. cerevisiae* population found in Malvar wine in the first 24 h of fermentation were low, between  $10^2$  and  $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ . It can be seen that native *Saccharomyces* yeasts of the cellar environment started to grow on the following days, but when *S. cerevisiae* CLI 889 was inoculated (day 13), this strain causes a progressive fall in the density until the end of sequential fermentations. It is well-known that *S. cerevisiae* yeasts are very competitive and normally dominates the fermentation due to its fast growth, efficient glucose competition, good ability to produce ethanol, and a higher tolerance to environmental stresses (Piškur et al., 2006). In this study, the growth of *S. cerevisiae* CLI 889 after its inoculation may have been affected by environmental factors, such as a low controlled temperature ( $18^\circ\text{C}$ ) during the fermentation process, a different availability of nutrients in the musts, and a wine elaboration without the addition of nutrients. After microsatellites multiplex analysis, the presence of the inoculated *S. cerevisiae* CLI 889 strain at the end of fermentation together with other *S. cerevisiae* strains could be confirmed; although in sequential culture, *S. cerevisiae* CLI 889 was found in lower percentage than in mixed cultures at the end of fermentation.

Nutrient content of the musts can modulate the yeast populations, the time of fermentation and secondary metabolites produced during alcoholic fermentation (Beltran et al., 2005; Andorrà et al., 2012; Kemsawasd et al., 2015b). In grape must, nitrogen is considered the main limiting nutrient for optimized growth and good fermentation performance (Bisson, 1999). We could observe when Malvar must II was used in the elaboration of wines, the fermentation length was increased in the cultures

(40 days) compared to the elaborations with must I that finished in 32 days; the higher YAN content of must I ( $218 \text{ mgN L}^{-1}$ ) than must II ( $100 \text{ mgN L}^{-1}$ ) could have influence in the fermentation rate in agreement with other studies (Bely et al., 1990; Monteiro and Bisson, 1992; Beltran et al., 2005). Medina et al. (2012) noticed a negative effect of non-*Saccharomyces* yeasts on nutrient availability for *S. cerevisiae* reducing its ability to grow, especially when it was sequentially inoculated. In the tested sequential fermentations, it could be possible that the YAN consumption by non-*Saccharomyces* would explain the slow growth of *S. cerevisiae* CLI 889, although *S. cerevisiae* population was eventually greater at final of fermentation in all cases, since it is well-known that *S. cerevisiae* strains show a favorable adaptation to the nitrogen-limited wine fermentation environment (Marsit et al., 2015). Additionally, a higher alcohols production (isobutanol, isoamyl alcohol, metionol, and  $\beta$ -phenylethyl alcohol) has been noted in fermentations elaborated with Malvar must II. This is related to the nitrogen concentration, the less nitrogen there is available in the fermentation medium, the more higher alcohols are produced (Beltran et al., 2005; Andorrà et al., 2012). The higher alcohols, along with glycerol, are the end-products of reductive pathway alternatives to the ethanol products. However, we did not detect in all co-cultures a significant decrease in the ethanol content with regard to their controls. Other volatile compounds as acetates, ethyl esters, and 1-propanol have also presented positive correlation with the level of nitrogen in the fermentation process (Rapp and Versini, 1995), this correlation can be observed for most of these compounds when the wines were elaborated with must I.

In terms of glycerol content, we can confirm the use of the tested non-*Saccharomyces* strains provides an enhancement of glycerol both at laboratory scale and at the pilot scale with the exception of *L. thermotolerans* 9-6C that did not produce high concentrations with respect to its controls at both scales. It is well-known that several non-*Saccharomyces* yeasts can considerably increase the glycerol concentrations in wine (Soden et al., 2000; Cominiti et al., 2011; Englezos et al., 2015; Benito et al., 2016b). Glycerol is one of the major compounds produced during wine fermentation, and it is important in yeast metabolism for regulating the redox potential in the cell (Prior et al., 2000). This compound contributes to mouth-feel, sweetness, and complexity in wines (Ciani and Maccarelli, 1998), but its production is usually linked to increased acetic acid production (Prior et al., 2000). In our results, the volatile acidity values measured as grams per liter of acetic acid, were kept low, especially at the pilot scale, with a particular decline in volatile acidity produced by *T. delbrueckii* CLI 918 in sequential culture.

In respect of the oenological parameters studied, the behavior of the yeast strains and the wine styles were similar regardless of the scale of fermentation tested. However, due to the type of vinification being different, some parameters changed at the pilot scale. Most of the wines can be considered as dry since their sugar content was less than  $4 \text{ g L}^{-1}$  at final of fermentation (Belitz and Grosch, 1999), with the exception of pure culture of *S. cerevisiae* p-ScI and mixed culture of *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* (m-Mp/ScI) (Supplementary Table S1). Generally, volatile acidity values are lower for all co-cultures in this work.

Sequential culture of *T. delbrueckii*/S. *cerevisiae* (s-Td/ScI), in comparison with its control (p-ScI), was distinguished for a significant decrease in volatile acidity ( $0.34 \text{ g L}^{-1}$ ) and an increase of glycerol content (Supplementary Table S1). In relation with aromatic compounds, sequential culture of *T. delbrueckii* presented higher concentration of  $\beta$ -phenylethyl alcohol, and esters, such as ethyl butyrate, ethyl isovalerate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, and 2-phenylethyl acetate (Supplementary Table S2) associated with the fruity and floral character of this wine.

In relation with cultures elaborated with *L. thermotolerans* 9-6C and *S. cerevisiae* CLI 889, the effect of *L. thermotolerans* on oenological and sensorial properties of wines (increase of lactic acid, glycerol, and  $\beta$ -phenylethyl alcohol) depends on the way of inoculation with *S. cerevisiae* (Kapsopoulou et al., 2007; Gobbi et al., 2013). We observed a higher lactic acid and  $\beta$ -phenylethyl alcohol content in sequential culture due to *L. thermotolerans* 9-6C growth before *S. cerevisiae* CLI 889 inoculation. *L. thermotolerans* seems to be dominant over *S. cerevisiae* due to the significant enhancement in total acidity and, consequently, a decrease of pH. In contrast, this behavior appears to be softened in mixed culture. This result contrasts with other studies (Gobbi et al., 2013; Benito et al., 2016a) that also observed this pattern of competitiveness in the different inoculation strategies with *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae*.

Our results showed that *C. stellata* CLI 920, along with *L. thermotolerans* 9-6C, are strains that produce lactic acid and, therefore, they increase the total acidity, both at the laboratory scale using sterile Malvar must and at the pilot scale. This production could be related with the higher concentration of ethyl lactate observed in both sequential inoculations since this ester is produced by esterification from acid lactic and ethanol (Inaba et al., 2009; Delgado et al., 2010). Higher concentrations of ethyl lactate after the use of co-cultures with *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* have been documented by other authors (Cominiti et al., 2011; Gobbi et al., 2013; Benito et al., 2015, 2016a).

In relation to the *S. pombe* strain, we tested in this work the *S. pombe* CLI 1079 yeast strain instead of the CLI 1085 strain used at laboratory scale due to the low growth capacity of this latest strain, that did impossible a successful *pie de cuve* at the pilot scale. The *S. pombe* CLI 1079 in sequential culture were able to finish the fermentation with residual sugars less than  $4 \text{ g L}^{-1}$ ; this strain presented a low consumption of the malic acid at the pilot scale, ending the fermentation with  $1.00 \text{ g L}^{-1}$  of malic acid, a value slightly lower than its control (p-ScII). Additionally, glycerol content was higher than

the control. This culture presented an elevated concentration of  $\beta$ -phenylethyl alcohol and the highest values of alcohols. Volatile compounds associated with cheese and butter aromas were higher in sequential culture of *S. pombe* than the control p-ScII.

## CONCLUSION

We can confirm that the inoculation strategies conducted at the laboratory scale produce a notable improvement in the quality of regional Malvar wines at the pilot scale also. Tasters were able to distinguish the different elaborations with respect to the controls and most appreciated wines by tasting panel were those elaborated in sequential cultures with *T. delbrueckii* CLI 918/S. *cerevisiae* CLI 889 and *C. stellata* CLI 920/S. *cerevisiae* CLI 889 and, mixed and sequential cultures with *L. thermotolerans* 9-6C in combination with the *S. cerevisiae* CLI 889 strain. Sequential cultures have produced more different wines with respect to the controls, providing organoleptic properties associated with the non-*Saccharomyces* strains, but more studies need to be carried out varying the moment of inoculation of *S. cerevisiae* strain in these cultures to prevent native *S. cerevisiae* growth on musts, and the reduction of the fermentation time. This work provides the basis for the implementation of new biotechnological strategies for improving Malvar wine quality and it can be tested in commercial wineries.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG, TA, and BE-Z designed the experiments, analyzed the results, discussion of the results and wrote the manuscript. MG, JC, and JMC performed experiments and analyzed results.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the project RM2010-00009-C03-01 funded by INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria). MG thanks the IMIDRA for his grant.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02520/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Albergaria, H., and Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2035–2046. doi: 10.1007/s00253-015-7255-0
- Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., et al. (2014). Oenological pre-fermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *Int. J. Food Microbiol.* 178, 87–97. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.009
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., and Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT Food Sci. Technol.* 49, 8–13. doi: 10.1016/j.lwt.2012.04.008
- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., and Mas, A. (2010). Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative

- PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 257–262. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.003
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 25, 849–856. doi: 10.1016/j.fm.2008.05.005
- Arroyo, T. (2000). *Estudio de la Influencia de Diferentes Tratamientos Enológicos en la Evolución de la Microbiota y en la Calidad de Los Vinos Elaborados con la Variedad "Airen", en la D.O. "Vinos de Madrid"*. Master's thesis, University of Alcalá, Alcalá de Henares.
- Arroyo, T., Cordero, G., Serrano, A., and Valero, E. (2010). "β-Glucosidase production by non-*Saccharomyces* yeasts isolated from vineyard," in *Proceedings of the 12th Weurman Symposium Expression of Multidisciplinary Flavour Science*, eds I. Blank, M. Wüst, and C. Yeretzian (Winterthur: ZHAW), 359–362.
- Arroyo, T., Lozano, J., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., Santos, J. P., and Horrillo, C. (2009). Evaluation of wine aromatic compounds by a sensory human panel and an electronic nose. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11543–11549. doi: 10.1021/jf902109y
- Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J. M., and Aznar, M. (2013). Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines. *Food Res. Int.* 53, 252–259. doi: 10.1016/j.foodres.2013.04.006
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243–259. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025
- Belitz, H. D., and Grosch, W. (1999). "Carbohydrates," in *Food Chemistry*, eds H.-D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, (Berlin: Springer), 248–339. doi: 10.1007/978-3-662-07281-3
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozés, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.* 53, 996–1002. doi: 10.1021/jf0487001
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., and Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319–324.
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., and Benito, S. (2016a). Quality and composition of Airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachanea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 54, 135–144. doi: 10.17113/ftb.54.02.16.4220
- Benito, Á., Jeffares, D., Palomero, F., Calderón, F., Bai, F. Y., Bähler, J., et al. (2016b). Selected *Schizosaccharomyces pombe* strains have characteristics that are beneficial for winemaking. *PLOS ONE* 11:e0151102. doi: 10.1371/journal.pone.0151102
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., et al. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717. doi: 10.1007/s00217-015-2497-8
- Bisson, L. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107–119.
- Branco, P., Viana, T., Albergaria, H., and Arneborg, N. (2015). Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 112–118. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.015
- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., Comitini, F., and Vita, S. (2014). Sequential fermentation using non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *BIOWeb Conf.* 3, 2014–2016. doi: 10.1051/bioconf/20140302015
- Ciani, M., and Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Curr. Opin. Food Sci.* 1, 1–6. doi: 10.1016/j.cofs.2014.07.001
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123–133. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x
- Ciani, M., and Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 199–203. doi: 10.1023/A:1008825928354
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J. A., et al. (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol.* 7:642. doi: 10.3389/fmicb.2016.00642
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., and Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 29–43. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008
- Cominiti, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. doi: 10.1016/j.fm.2010.12.001
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D., et al. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 132–139. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., and Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* 236, 193–207. doi: 10.1007/s00217-012-1874-9
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Gil-Díaz, M., García, M., Cabellos, J., and Arroyo, T. (2016). Improvement of Malvar wine quality by use of locally-selected *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Fermentation* 2:7. doi: 10.3390/fermentation2010007
- Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J. M., et al. (2017). Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Front. Microbiol.* 8:2025. doi: 10.3389/fmicb.2017.02025
- David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., et al. (2014). High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 811–821. doi: 10.1007/s10295-014-1427-2
- Delgado, P., Sanz, M. T., Beltrán, S., and Núñez, L. A. (2010). Ethyl lactate production via esterification of lactic acid with ethanol combined with pervaporation. *Chem. Eng. J.* 165, 693–700. doi: 10.1016/j.cej.2010.10.009
- Divol, B., and Lonvaud-Funel, A. (2005). Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99, 85–93. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02578.x
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., and Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* 199, 33–40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–337. doi: 10.1099/00207713-49-1-329
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00245-9
- García, M., Arroyo, T., Crespo, J., Cabellos, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2017). Use of native non-*Saccharomyces* strain: a new strategy in D.O. "Vinos de Madrid" (Spain) wines elaboration. *Eur. J. Food Sci. Technol.* 5, 1–31.
- Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T., and Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin "Vinos de Madrid" (Spain). *Anal. Chim. Acta* 563, 145–153. doi: 10.1016/j.aca.2005.11.060
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2013). *Lachanea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.004
- Goddard, M. R. (2008). Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 89, 2077–2082. doi: 10.2307/41739278
- Gump, B. H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., and Whiton, R. S. (2002). Comparison of analytical methods for prediction of prefermentation nutritional status of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 325–329.
- Hansen, E. H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C., and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 541–547. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x



- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030. doi: 10.1038/nbt0993-1026
- Inaba, C., Maekawa, K., Morisaka, H., Kuroda, K., and Ueda, M. (2009). Efficient synthesis of enantiomeric ethyl lactate by *Candida antarctica* lipase B (CALB)-displaying yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 859–864. doi: 10.1007/s00253-009-1931-x
- Ivey, M. L., and Phister, T. G. (2011). Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1619–1634. doi: 10.1007/s10295-011-1020-x
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., and Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 735–739. doi: 10.1007/s11274-006-9283-5
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M. G., Caldeira, H., and Arneborg, N. (2015a). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362:fnv103. doi: 10.1093/femsle/fnv103
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., and Arneborg, N. (2015b). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10191–10207. doi: 10.1007/s00253-015-6835-3
- Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., Portillo, M., and del, C. (2016). *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* competition during microvinification under different sugar and nitrogen conditions. *Front. Microbiol.* 7:1959. doi: 10.3389/fmicb.2016.01959
- Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Querol, A., Bramardi, S., and Caballero, A. C. (2006). Relationship between molecular and enological features of Patagonian wine yeasts: relevance in selection protocols. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 827–833. doi: 10.1007/s11274-005-9110-4
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F. X., Couloux, A., Guy, J., et al. (2015). Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1695–1707. doi: 10.1093/molbev/msv057
- Martini, A., Ciani, M., and Scorzett, G. (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 435–440.
- Martorell, P., Querol, A., and Ferna, M. T. (2005). Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6823–6830. doi: 10.1128/AEM.71.11.6823
- Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., and Albertin, W. (2016). The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges. *Front. Microbiol.* 6:1563. doi: 10.3389/fmicb.2015.01563
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 245–250. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012
- Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136–141. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x
- Monteiro, F. F., and Bisson, L. F. (1992). Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 1–10.
- Nguyen, H. V., and Panon, G. (1998). The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species. *Sci. Aliments* 18, 515–526. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.013
- Nissen, P., and Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 180, 257–263. doi: 10.1007/s00203-003-0585-9
- Nissen, P., Neilsen, D., and Arneborg, N. (2004). The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeasts play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 543–550. doi: 10.1007/s00253-003-1487-0
- Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341. doi: 10.1002/yea.965
- Pallmann, C. L., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D. A., and Bisson, L. F. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 198–203.
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 336–345. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012
- Phister, T. G., and Mills, D. A. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430–7434. doi: 10.1128/AEM.69.12.7430
- Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., and Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183–186. doi: 10.1016/j.tig.2006.02.002
- Prior, B. A., Toh, T. H., Jolly, N., Baccari, C., and Mortimer, R. K. (2000). Impact of yeast breeding for elevated glycerol production on fermentative activity and metabolite formation in Chardonnay wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 92–99.
- Puertas, B., Jiménez, M. J., Cantos-Villar, E., Cantoral, J. M., and Rodríguez, M. E. (2016). Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. *J. Appl. Microbiol.* 122, 733–746. doi: 10.1111/jam.13375
- Quiros, C., Herrero, M., García, L. A., and Díaz, M. (2009). Quantitative approach to determining the contribution of viable-but-nonculturable subpopulations to malolactic fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2977–2981. doi: 10.1128/AEM.01707-08
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñero, A., and Ribas, J. C. (2015). A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Front. Microbiol.* 6:983. doi: 10.3389/fmicb.2015.00983
- Rapp, A., and Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Dev. Food Sci.* 37, 1659–1694. doi: 10.1016/S0167-4501(06)80257-8
- Rawsthorne, H., and Phister, T. G. (2006). A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.003
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., and Alexandre, H. (2013). Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* 8:e77600. doi: 10.1371/journal.pone.0077600
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A., and Guzmán, J. M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 1155–1161. doi: 10.1016/j.fm.2011.03.008
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6241–6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., and Alexandre, H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438–447. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.020
- Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H., and Henschke, P. A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21–30. doi: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M., and Zhao, Y. P. (2014). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behavior and wine aroma of cherry wines. *Food Microbiol.* 44, 15–23. doi: 10.1016/j.fm.2014.05.007
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., and Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1959–1967. doi: 10.1007/s11274-014-1618-z
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M., and Arroyo, T. (2012). Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and

- vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 112, 302–315. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Tofalo, R., Schirone, M., Corsetti, A., and Suzzi, G. (2012). Detection of *Brettanomyces* spp. in red wines using real-time PCR. *J. Food Sci.* 77, 545–549. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02871.x
- Türkel, S., and Ener, B. (2009). Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. *Z. Naturforsch. C* 64, 405–410. doi: 10.1515/znc-2009-5-618
- Vaudano, E., and García-Moruno, E. (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiol.* 25, 56–64. doi: 10.1016/j.fm.2007.08.001
- Walters, L. S., and Thiselton, M. R. (1953). Utilization of lysine by yeasts. *J. Inst. Brew.* 59, 401–404. doi: 10.1002/j.2050-0416.1953.tb02736.x
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., and Mas, A. (2014). Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 1–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.014
- Wang, C., Mas, A., and Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 67–74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.022
- Wang, C., Mas, A., and Esteve-Zarzoso, B. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. *Front. Microbiol.* 7:502. doi: 10.3389/fmicb.2016.00502
- Zoecklein, B., Fugelsang, K. C., Gump, B., and Nury, F. S. (1999). *Wine Analysis and Production*. New York, NY: Aspen Publishers. doi: 10.1007/978-1-4757-6967-8
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., and Masneuf-Pomarede, I. (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiol.* 27, 559–567. doi: 10.1016/j.fm.2010.01.006

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 García, Esteve-Zarzoso, Crespo, Cabellos and Arroyo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

#### ***Material Suplementario***

El material suplementario de este artículo puede ser encontrado online, en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02520/full#supplementary-material>

No obstante, las Tablas S1 y S2 correspondientes al material complementario son insertadas en las siguientes dos páginas.



Table S1 (Supplementary Material). Principal oenological parameters at the end of the different fermentations. Values are means  $\pm$  standard deviations of triplicate fermentations. \* Means statistically different from the control,  $p < 0.05$ . <sup>a</sup>Abbreviations related with the type of culture employed and the yeast strains are explained in Figure 2. <sup>b</sup>Fermentations with *S. cerevisiae* pure cultures (p-ScI and p-ScII) were taken as the control in each must batch (must I and must II).

Type of culture <sup>a</sup>	Ethanol %, v/v	pH	Volatile acidity g/L acetic acid	Total acidity g/L tartaric acid	Reducing sugars g/L	Glycerol g/L	Malic acid g/L	Lactic acid g/L
p-ScI <sup>b</sup>	13.55 $\pm$ 0.05	3.03 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	6.76 $\pm$ 0.01	9.86 $\pm$ 0.23	6.15 $\pm$ 0.08	0.73 $\pm$ 0.06	<0.50
s-Td/ScI	13.50 $\pm$ 0.09	3.04 $\pm$ 0.03	0.34 $\pm$ 0.03*	6.88 $\pm$ 0.22	2.95 $\pm$ 0.66*	7.00 $\pm$ 0.84	0.47 $\pm$ 0.06*	<0.50
m-Mp/ScI	13.42 $\pm$ 0.09	3.03 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.04	6.76 $\pm$ 0.12	9.17 $\pm$ 0.69	6.55 $\pm$ 0.08	0.30 $\pm$ 0.01*	<0.50
p-ScII <sup>b</sup>	13.00 $\pm$ 0.00	3.30 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.00	5.30 $\pm$ 0.10	3.75 $\pm$ 0.01	4.70 $\pm$ 0.12	1.10 $\pm$ 0.09	<0.50
s-Sp/ScII	13.00 $\pm$ 0.10	3.30 $\pm$ 0.00	0.53 $\pm$ 0.06*	5.67 $\pm$ 0.12*	3.90 $\pm$ 0.52	5.37 $\pm$ 0.09*	1.00 $\pm$ 0.35	<0.50
s-Cs/ScII	13.20 $\pm$ 0.00*	3.30 $\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.00*	6.23 $\pm$ 0.12*	2.37 $\pm$ 0.15*	5.41 $\pm$ 0.08*	0.60 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.06*
m-Lt/ScII	13.30 $\pm$ 0.00*	3.30 $\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.00*	5.40 $\pm$ 0.10	3.70 $\pm$ 0.10	4.86 $\pm$ 0.24	1.00 $\pm$ 0.01	<0.50
s-Lt/ScII	13.07 $\pm$ 0.12	3.10 $\pm$ 0.06*	0.57 $\pm$ 0.06*	> 7.00*	2.67 $\pm$ 0.65*	4.62 $\pm$ 0.25	<0.20*	2.40 $\pm$ 0.60*

Table S2 (Supplementary Material). Volatile compounds (mg L<sup>-1</sup>), ODE (odour description), and OTV (odour threshold value, mg L<sup>-1</sup>, Balboa-Lagunero *et al.* 2013) of different types of inoculation with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains (Td, *T. delbrueckii*; Mp, *M. pulcherrima*; Sp, *S. pombe*; Cs, *C. stellata*; and Lt, *L. thermotolerans*). Values are the mean  $\pm$  SD of triplicate fermentations. \* Means statistically different from the control,  $p < 0.05$ .<sup>a</sup> Abbreviations related with the type of culture employed and the yeast strains are explained in Figure 2. <sup>b</sup> Fermentations with *S. cerevisiae* pure cultures (p-Sel and p-ScII) were taken as the control in each must batch (must I and must II).

Compound			ODE		OTV	Type of culture <sup>a</sup>					
			p-ScII <sup>b</sup>	s-Td/ScI	m-Mp/ScI	p-ScII <sup>b</sup>	s-Sp/ScII	s-Cs/ScII	m-Lr/ScII	s-Lr/ScII	
Alcohols	1-Propanol	Alcohol, ripe fruit	9	5.11 ± 0.43	6.16 ± 1.19	4.35 ± 0.80	1.62 ± 0.40	2.02 ± 0.07	2.16 ± 0.28	1.84 ± 0.22	2.01 ± 0.14
	1-Butanol	Soap, fatty, diesel	150	0.81 ± 0.11	1.18 ± 0.19*	0.29 ± 0.07*	0.49 ± 0.08	0.47 ± 0.04	0.79 ± 0.21	0.55 ± 0.08	0.77 ± 0.08
	Isobutanol	Bitter, fusel, alcohol	40	17.65 ± 1.62	20.91 ± 2.70	11.27 ± 0.45*	29.42 ± 2.28	31.62 ± 5.71	33.35 ± 4.23	27.85 ± 3.19	25.91 ± 2.48
	Isoamyl alcohol	Harsh, bitter	30	115.83 ± 10.76	183.84 ± 17.09*	72.74 ± 0.80*	267.85 ± 17.10	337.65 ± 8.21*	298.90 ± 9.02	256.12 ± 10.42	299.52 ± 13.36
	(Z)-3-Hexen-1-ol	Lemon, fresh	0.4	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.00
	1-Hexanol	Green grass, fresh	8	1.22 ± 0.06	0.92 ± 0.13*	0.85 ± 0.05*	1.91 ± 0.06	2.50 ± 0.05	2.96 ± 0.78	2.00 ± 0.41	2.75 ± 0.14
	Menthol	Garlic	1	0.21 ± 0.03	0.57 ± 0.05*	0.15 ± 0.02	0.65 ± 0.08	1.87 ± 0.26*	1.75 ± 0.63	0.66 ± 0.21	1.55 ± 0.60
	Benzyl alcohol	Pleasant, soft	200	0.01 ± 0.00	0.13 ± 0.00*	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
	β-Phenylethyl alcohol	Flowery, roses	14	8.81 ± 0.56	20.41 ± 3.15*	6.53 ± 0.39	15.50 ± 1.90	55.74 ± 3.26*	56.14 ± 9.00*	32.75 ± 8.62	69.21 ± 8.72*
	Σ Alcohols			149.78 ± 13.47	234.22 ± 23.64*	96.31 ± 0.61*	317.58 ± 21.92	432.05 ± 17.59*	396.51 ± 19.22*	321.91 ± 28.27	401.90 ± 6.96*
Esters	Ethyl butyrate	Fruity, sweet, apple	0.02	0.41 ± 0.04	0.63 ± 0.07*	0.33 ± 0.00	0.42 ± 0.02	0.34 ± 0.07	0.39 ± 0.08	0.44 ± 0.09	0.29 ± 0.02
	Ethyl isovalerate	Fruity, sweet, banana	0.003	0.15 ± 0.01	0.36 ± 0.03*	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.24 ± 0.07	0.14 ± 0.03	0.24 ± 0.07
	Ethyl isobutyrate	Fruity, pineapple	0.015	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.02*	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.01
	Isoamyl acetate	Banana, sweet, fruity	0.03	2.04 ± 0.44	5.75 ± 0.98*	1.20 ± 0.04	1.59 ± 0.06	1.07 ± 0.21	1.41 ± 0.20	1.58 ± 0.33	1.21 ± 0.15
	Ethyl hexanoate	Pineapple, apple	0.014	0.64 ± 0.16	0.81 ± 0.05	0.45 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.91 ± 0.13	1.05 ± 0.30	0.69 ± 0.14	0.85 ± 0.05
	Ethyl-3-hydroxybutyrate	Fruity	20	0.11 ± 0.02	0.29 ± 0.05*	0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.00	0.28 ± 0.08*	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.05
	Hexyl acetate	Fruity, green, pear	1	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.08 ± 0.01*	0.14 ± 0.00	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01*
	2-Phenylethyl acetate	Flowery, lilac	0.25	0.07 ± 0.02	4.09 ± 0.27*	2.57 ± 0.18*	0.17 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.19 ± 0.08	0.10 ± 0.02	0.16 ± 0.01
	Diethyl succinate	Camphor	100	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.14 ± 0.02*	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.02
	Ethyl octanoate	Fresh, flowery, pineapple	0.58	0.50 ± 0.12	0.46 ± 0.01	0.42 ± 0.00	0.62 ± 0.14	0.88 ± 0.10	1.03 ± 0.28	0.65 ± 0.20	0.62 ± 0.13
Ethyl lactate	Lactic	154	2.07 ± 0.14	3.09 ± 0.32*	1.60 ± 0.05	2.89 ± 0.18	3.07 ± 0.08	35.54 ± 0.02*	14.24 ± 0.21	110.71 ± 6.48*	
Σ Esters			6.18 ± 0.90	15.67 ± 1.42*	6.88 ± 0.20	6.86 ± 0.16	7.08 ± 0.46	40.40 ± 1.26*	18.15 ± 2.36	114.50 ± 6.69*	
Acids	Isobutyric acid	Rancid, butter, cheese	0.05	0.53 ± 0.05	0.94 ± 0.15*	0.34 ± 0.03	1.46 ± 0.22	2.50 ± 0.68	4.20 ± 0.87*	1.39 ± 0.30	2.64 ± 0.60
	Butyric acid	Butter, cheese, stinky	0.173	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.19 ± 0.03*	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02
	Isovaleric acid	Cheese	0.033	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.15 ± 0.10	1.52 ± 0.16	3.39 ± 0.17*	3.96 ± 1.01*	1.37 ± 0.09	3.27 ± 0.72*
	Hexanoic acid	Cheese	0.42	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	3.78 ± 0.45	5.22 ± 0.31	5.89 ± 1.98	4.08 ± 0.96	4.06 ± 0.41
	Octanoic acid	Sweet, cheesy	0.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	7.62 ± 1.11	9.59 ± 1.67	11.29 ± 3.82	8.06 ± 1.59	7.54 ± 1.10
	Decanoic acid	Rancid, fatty	1	0.78 ± 0.15	1.04 ± 0.02*	0.57 ± 0.02	1.23 ± 0.20	1.50 ± 0.20	2.41 ± 0.66*	1.18 ± 0.38	1.97 ± 0.35
	Σ Acids			1.50 ± 0.21	2.21 ± 0.17*	1.20 ± 0.08	15.76 ± 1.62	22.38 ± 1.79	27.94 ± 8.83*	16.23 ± 3.46	19.65 ± 1.43
	Diacetyl	Butter	0.1	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.05 ± 0.00	0.44 ± 0.04	0.49 ± 0.13	0.52 ± 0.16	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.13
	Furfural	Bread, toasty, candy	15	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.03
	Benzaldehyde	Sweet, candy, wood	5	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Aldehydes/Ketones	Phenylacetaldehyde	Roses	1	0.16 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Acetoin	Butter	150	2.24 ± 0.25	0.09 ± 0.04*	0.18 ± 0.08*	1.87 ± 0.70	2.12 ± 0.25	2.46 ± 0.52	1.51 ± 0.43	2.14 ± 0.28
	Σ Aldehydes/Ketones			2.73 ± 1.06	0.49 ± 0.17*	0.42 ± 0.06*	2.41 ± 0.77	2.61 ± 0.33	3.00 ± 1.10	2.01 ± 0.82	2.57 ± 0.63
	γ-Butyrolactone	Coconut	35	2.07 ± 0.30	2.06 ± 0.28	1.26 ± 0.01*	4.23 ± 0.72	4.58 ± 0.73	5.10 ± 1.02	5.04 ± 1.33	3.30 ± 0.87

**3.5. Polysaccharides and Oligosaccharides Produced on Malvar Wines Elaborated with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 and *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 Native Yeasts from D.O. “Vinos de Madrid”**

García, M., Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., Crespo, J. y Doco, T.

Publicado en:

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65,  
pp. 6656–6664. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01676

#### **Polisacáridos y oligosacáridos producidos en vinos Malvar con las levaduras nativas *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 y *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 procedentes de la D.O. “Vinos de Madrid”**

##### **RESUMEN**

Se ha estudiado los polisacáridos y oligosacáridos liberados en los vinos blancos Malvar elaborados mediante cultivos puro, mixto y secuencial con las levaduras nativas *T. delbrueckii* CLI 918 y *S. cerevisiae* CLI 889 de la D.O. “Vinos de Madrid”. Ambas fracciones procedentes de los vinos Malvar fueron separadas por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución. La composición glucosídica y los enlaces en los polisacáridos del vino fueron estudiados por cromatografía GC-EI-MS. Las distribuciones de masa molar fueron determinadas por SEC-MALLS, y la viscosidad fue determinada con un viscosímetro diferencial. Las especies de levadura y el tipo de inoculación tienen un impacto importante en la composición y estructura de los carbohidratos del vino. Los residuos de manosa de las manoproteínas fueron significativamente predominantes en aquellos cultivos donde *T. delbrueckii* estaba presente en el proceso de fermentación en comparación con cuando el cultivo puro de *S. cerevisiae* estaba presente en el proceso de fermentación. Los residuos de galactosa de los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa presentaron valores más altos en el cultivo de *S. cerevisiae*, indicando que *S. cerevisiae* libera menos manoproteínas que *T. delbrueckii*. Además, nosotros informamos de las diferencias estructurales entre las manoproteínas liberadas por *T. delbrueckii* CLI 918 y de aquellas liberadas por *S. cerevisiae* CLI 889. Estos resultados ayudan a proporcionar información importante sobre los polisacáridos y oligosacáridos liberados de la pared celular de las uvas Malvar y los carbohidratos liberados a partir de cada especie de levadura.

**Contribución personal al manuscrito:** Yo he participado en la elaboración de los experimentos, en el análisis y discusión de los resultados, y en la escritura del manuscrito.

# Polysaccharides and Oligosaccharides Produced on Malvar Wines Elaborated with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 and *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 Native Yeasts from D.O. "Vinos de Madrid"

Margarita García,<sup>†</sup> Rafael Apolinar-Valiente,<sup>§</sup> Pascale Williams,<sup>§</sup> Braulio Esteve-Zarzoso,<sup>‡</sup> Teresa Arroyo,<sup>\*,†</sup> Julia Crespo,<sup>†</sup> and Thierry Doco<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Agroalimentación, IMIDRA, Ctra. A2 km 38.200, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>§</sup>INRA, Joint Research Unit 1083, Sciences for Enology, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier, France

<sup>‡</sup>Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Spain

**ABSTRACT:** Polysaccharides and oligosaccharides released into Malvar white wines elaborated through pure, mixed, and sequential cultures with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 and *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 native yeasts from D.O. "Vinos de Madrid" were studied. Both fractions from different white wines were separated by high-resolution size-exclusion chromatography. Glycosyl composition and wine polysaccharide linkages were determined by GC–EI-MS chromatography. Molar-mass distributions were determined by SEC–MALLS, and intrinsic viscosity was determined by differential viscometer. Yeast species and type of inoculation have a significant impact on wine carbohydrate composition and structure. Mannose residues from mannoproteins were significantly predominant in those cultures where *T. delbrueckii* was present in the fermentation process in comparison with when pure cultures of *S. cerevisiae* were present in the fermentation process. Galactose residues from polysaccharides rich in arabinose and galactose presented greater values in pure cultures of *S. cerevisiae*, indicating that *S. cerevisiae* released fewer mannoproteins than *T. delbrueckii*. Moreover, we reported structural differences between mannoproteins released by *T. delbrueckii* CLI 918 and those released by *S. cerevisiae* CLI 889. These findings help to provide important information about the polysaccharides and oligosaccharides released from the cell walls of Malvar grapes and the carbohydrates released from each yeast species.

**KEYWORDS:** Malvar white wines, native yeast, mannoproteins, polysaccharides, oligosaccharides

## INTRODUCTION

The study of wine polysaccharides has acquired great interest in recent years owing to its role on a number of technological and sensorial properties in wine. Numerous studies have clearly proven that these macromolecules have many positive oenological features such as protection against tartrate salt crystallization,<sup>1</sup> prevention of protein haze formation in white wines,<sup>2</sup> reduction of astringency,<sup>3,4</sup> interaction with tannins,<sup>5</sup> increased sweetness and increased body and mouth feel,<sup>3</sup> and formation of specific coordination complexes with Pb<sup>2+</sup> ions.<sup>6</sup> In sparkling wines, foam characteristics have been correlated with the type, the molecular weight, and the glycosyl composition of polysaccharides.<sup>7</sup> Polysaccharides found in wine originate from grapes, yeasts, and bacteria during the winemaking. Those originating from grape cell walls are polysaccharides rich in arabinose and galactose [PRAGs, which comprise arabinans, arabinogalactans, and arabinogalactan proteins],<sup>8</sup> homogalacturonans,<sup>9</sup> and rhamnogalacturonans of type II (RG-II),<sup>10</sup> whereas those released by microorganisms are mainly mannoproteins (MPs) produced by yeasts during the alcoholic fermentation or aging on lees,<sup>11</sup> and glucan-like structures by bacteria.<sup>12</sup>

However, the oligosaccharide composition in wine has only recently been studied.<sup>13–16</sup> These molecules are linked to the defensive responses of plants.<sup>17</sup> Moreover, oligosaccharides can be found in important medicinal and food applications.<sup>18</sup> It

should be noted that oligosaccharides can chelate cations, which can be important for wines. The structure and the amounts of oligosaccharides, as well as in the case of polysaccharides, depend on several factors, such as the grape origin,<sup>19</sup> the grape cultivar,<sup>16</sup> and the winemaking process and can be modified by enzyme treatment.<sup>19</sup> Therefore, it would appear to be necessary to go further with the identification, quantification, and composition of oligosaccharides in different wines in order to better understand their influence on technological and organoleptic properties.

Recently, Giovani et al.<sup>20</sup> have shown the high capacity of non-*Saccharomyces* wine yeasts to release important polysaccharides into wine during alcoholic fermentation. The natural capacity of non-*Saccharomyces* yeasts to release complex carbohydrates could be considered as selection criteria of these yeasts to wine elaboration.<sup>21</sup> The role of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking has been revised in recent years; the use of controlled mixed fermentations as a biotechnological tool has been promoted in order to enhance special and specific characteristics of a wine thus improving its complexity.<sup>21</sup> This practice has also been reported as being able to increase some

**Received:** April 12, 2017

**Revised:** June 29, 2017

**Accepted:** July 1, 2017

**Published:** July 1, 2017



desirable metabolites, such as some acetate esters<sup>22</sup> and glycerol.<sup>21</sup> Moreover, some non-*Saccharomyces* yeasts have been reported as being able to release more polysaccharides than *S. cerevisiae* strains during alcoholic fermentation.<sup>20</sup>

*T. delbrueckii* was one of the first commercially available non-*Saccharomyces* for the winemaking industry. During wine fermentation, *T. delbrueckii* in pure cultures and in mixed cultures with *S. cerevisiae* has produced wines with higher sensory complexity and floral and fruity aromas because of its capacity to produce high concentrations of alcohols, esters, terpenes, and phenolic aldehydes as well as other compounds like 2-phenylethanol and linalool.<sup>23</sup> Its ability to produce wines with lower volatile acidity and with a lower acetaldehyde and acetoin content has also been described.<sup>24</sup> Depending on the strain, *T. delbrueckii* can produce low/medium amounts of glycerol, succinic acid, and polysaccharides.<sup>20,25,26</sup> Moreover, *Torulaspora* genera is reported to be a good producer of enzymes such as  $\beta$ -glucosidases, pectinases, proteases, and those related to xylan degradation, but this capacity of enzyme secretion also depends on the yeast strain being analyzed.<sup>27</sup>

The Denomination of Origin (D.O.) "Vinos de Madrid", created in 1990, is located in the center of Spain (between 40° 16' N and 40° 24' N latitude) and covers an area of 8,390 ha. The climate of this agronomy zone is continental with temperatures ranging from a minimum of -8 °C in winter to a maximum of 41 °C in summer,<sup>28</sup> and the annual rainfall means are between 460 and 660 mm. The most-cultivated grape cultivars are Airén and Malvar (white) and Garnacha and Tempranillo (red) (all of them being *Vitis vinifera* L. cv.). Malvar is an autochthonous cultivar for this D.O., while Airén, Garnacha, and Tempranillo have major extensions all over the Iberian Peninsula. Part of the economic development of this area is based on wine production with winemakers searching for the production of high-quality wines with singular identity. The selection of native yeasts is an emerging tool that contributes to elaborate new styles of wines that are more competitive in the market.<sup>29</sup>

The aim of this study was to determine the polysaccharide and oligosaccharide release into Malvar white wines elaborated with *T. delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889 native yeasts from D.O. "Vinos de Madrid" in pure, mixed, and sequential cultures made with both strains. To date, this is the first report of the polysaccharide and oligosaccharide composition in regional Malvar wines using autochthonous *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts from this region.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Analytical reagent-grade chemicals were used in the present study. Ammonium sulfate supplied by Panreac Química (Barcelona, Spain) and Enozym Altair pectolytic enzymes obtained from Agrovín (Ciudad Real, Spain) were used during must preparation. The following compounds were used for polysaccharide and oligosaccharide isolation and analysis in the studied wines. Sodium chloride, phosphorus pentoxide, hydrogen chloride, trifluoroacetic acid, ammonia, acetone, glacial acetic acid, ethyl acetate, acetic anhydride, 70% perchloric acid, 1-methylimidazole, chloroform, and *n*-hexane were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Anhydrous methanol, sodium borodeuteride, and myo-inositol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, U.S.A.). Polyamide CC6 was supplied by Macherey-Nagel (Düren, Germany). Ammonium formate was supplied by Acros Organics (Geel, Belgium). Tri-Sil HTP Reagent was obtained from Thermo Scientific (Waltham, MA, U.S.A.).

**Yeast Strains.** The first yeast strain used for the elaboration of the wines was the *Saccharomyces* CLI 889 strain, selected as native strain

from D.O. "Vinos de Madrid" and characterized in the IMIDRA's laboratories based on some established and desirable oenological criteria.<sup>30</sup> This strain has been deposited in Spanish Type Culture Collection (CECT 13145). The second yeast strain used was *Torulaspora delbrueckii* CLI 918, selected according to its biotechnological potential.<sup>28</sup> *T. delbrueckii* CLI 918 has been described earlier as a strain with potential interest for its contribution to the aromatic wine profile, adding flowery and fruity notes, and its use was considered interesting in mixed starter cultures with *S. cerevisiae*.<sup>28</sup> This strain has also shown good fermentative capacity under different stress conditions.<sup>31</sup>

**Vinification Procedure.** Grapes from Malvar cultivar (*Vitis vinifera* L. cv.) were hand-collected from IMIDRA's experimental vineyard located in the Madrid winegrowing region, Spain (40° 31' N longitude, 3° 17' W latitude, and 610 m altitude) during the 2010 vintage at commercial maturity (21.5 °Brix, equivalent to about 205 g L<sup>-1</sup> of sugars). The grapes were gently destemmed and pressed, and the must was racked, homogenized, and clarified by pectolytic enzymes (1 g/hL) at 4 °C. Clear must was supplemented with nitrogen by adding ammonium sulfate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> up to a level of 250 mgN L<sup>-1</sup> before beginning the alcoholic fermentation.

Triplicate experiments were carried out in sterile flasks with 1 L of pasteurized (as indicated in García et al.<sup>32</sup>) Malvar must with constant agitation (150 rpm) in an 18 °C temperature-controlled room. Fermentations were divided into pure, mixed, and sequential cultures. Pure cultures were independently inoculated with 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of CLI 889 *S. cerevisiae* strain (culture considered as control) and 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of CLI 918 *T. delbrueckii* strain. Mixed fermentation trials were simultaneously inoculated with 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of *T. delbrueckii* and 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae* strain. Sequential fermentation trials were inoculated with 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> of the *T. delbrueckii* culture at first, and the addition of the *S. cerevisiae* strain (10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>) took place when the wine contained 5% alcohol (v/v). The fermentation progress was monitored by automatic weight using the software OPEx3 (Resolvica Inc., Chanhassen, MN) every 24 h until the end of the fermentation (constant weight). After fermentation, yeast cells and wines were separated by centrifugation (9000 rpm, 10 min, 4 °C); the pellets were discarded, and the wines were kept frozen until analysis.

Principal oenological parameters of final wines were measured by Fourier transform infrared spectroscopy in the laboratories of Liec Agroalimentaria S. L. (Manzanares, Spain), an accredited laboratory, conforming to UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 rules, for physico-chemical analysis in wines.

### Isolation of Polysaccharide and Oligosaccharide Fractions.

The polysaccharide and oligosaccharide fractions were isolated as previously described.<sup>4,7,13,15</sup> Briefly, Malvar white wines (5 mL) were partially depigmented in polyamide CC6 columns, with a 0.05–0.16 mm particle size and previously equilibrated with 1 M NaCl. Wine polysaccharides and oligosaccharides passed through the column and were eluted with two bed volumes of 1 M NaCl. The eluted fraction was concentrated in a centrifugal evaporator (EZ-2, Genevac, Ipswich, UK). High-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC) was performed by loading concentrated total wine carbohydrates on a system composed of a rheodyne sampling injector with a loop of 2 mL, an Intelligent pump 301 (FLOM, France), and a fraction collector Frac-920 (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, U.S.A.). Elution was performed on a Superdex-30 HR column (60 × 1.6 cm, Pharmacia, Sweden) with a precolumn (0.6 × 4 cm) equilibrated at 1 mL min<sup>-1</sup> with 30 mM ammonium formate at pH 5.6. The elution of polysaccharides and oligosaccharides was monitored with a RI 101 (Shodex Showa Denko, Japan) refractive index combined with Chromeleon software (Dionex, Sunnyvale, CA). The polysaccharide fraction was eluted between 41 and 55 min, while the oligosaccharide fraction was collected between 56 and 93 min.<sup>4,7,16</sup> The isolated fractions were freeze-dried, redissolved in water, and freeze-dried again four times to remove the ammonium salt.

**Glycosyl-Linkage Determination.** The glycosyl-linkage compositions were determined by GC-MS of the partially methylated alditol acetates. A total of 1 mg of polysaccharides in 0.5 mL of dimethyl sulfoxide was methylated using methyl sulfinyl carbanion and methyl



iodide.<sup>33</sup> Methylated samples were hydrolyzed with 2 M of trifluoroacetic acid for 75 min at 120 °C. The released methylated monosaccharides were converted in their corresponding alditols by treatment with NaBD<sub>4</sub> and then acetylated by adding ethyl acetate, acetic anhydride, and perchloric acid.<sup>34</sup> Partially methylated alditol acetates were analyzed by GC–EI–MS using a DB-1 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film), programming the temperature by holding at 135 °C for 10 min and then increasing 1.2 °C min<sup>-1</sup> to 180 °C, using hydrogen as the carrier gas on a Shimadzu GCMS-QP2010SE gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan).<sup>35</sup> Myoinositol was used as internal standard and to verify the rate of methylation. Response factors of partially methylated alditol acetates are those described by Sweet et al.<sup>36</sup> The validity of the used methods and their repeatability were checked according to Vidal et al.<sup>35</sup>

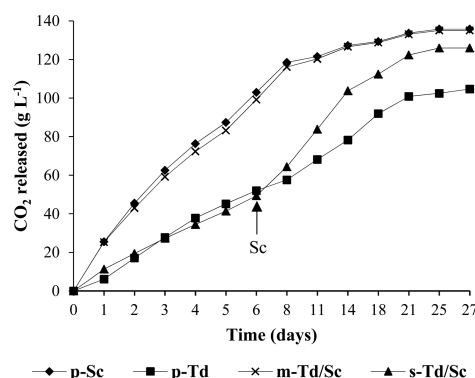
**Oligosaccharide Analysis.** The neutral and acidic sugar compositions were determined after solvolysis with anhydrous MeOH containing 0.5 M HCl (80 °C, 16 h), by GC of their per-O-trimethylsilylated methyl glycoside derivatives.<sup>37</sup> The TMS derivatives were separated on two DB-1 capillary columns (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film) (temperature programming: 120–145 °C at 1.5 °C min<sup>-1</sup>, 145–180 °C at 0.9 °C min<sup>-1</sup>, and 180–230 °C at 50 °C min<sup>-1</sup>), coupled to a single injector inlet through a two-holed ferrule, with hydrogen as the carrier gas on a Shimadzu GCMS-QP2010SE gas chromatograph. The outlet of the one column was directly connected to a FID at 250 °C, and the second column, via a deactivated fused-silica column (0.25 m × 0.11 μm i.d.), was connected to a mass detector. Samples were injected in the pulse-split mode with a split ratio of 20:1. The transfer line to the mass was set at 280 °C. Electron-ionization mass spectra were obtained from *m/z* 50 to 400 every 0.2 s in the total ion-monitoring mode using an ion-source temperature of 200 °C, a filament emission current of 60 μA, and an ionization voltage of 70 eV.

**Determination of Molar Mass of Wine Polysaccharides.** Molar-mass distributions, molar weight, number-average mass ( $M_w$  and  $M_n$  in g/mol), polydispersity index ( $M_w/M_n$ ), and intrinsic viscosity ( $[\eta]$  in mL g<sup>-1</sup>) were determined at 25 °C by coupling size-exclusion chromatography with a multiangle light-scattering device (MALLS), a differential viscometer, and a differential refractive index detector. SEC elution was performed on an OH-pack guard followed by two serial Shodex OH-pack KB-804 and KB-805 columns (0.8 × 30 cm; Shodex Showa Denko, Japan) at a 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate in 0.1 M LiNO<sub>3</sub> after filtration through a 0.1 μm filter unit. The MALLS photometer, a DAWN-HELEOS from Wyatt Technology Inc. (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, U.S.A.), was equipped with a Ga–As laser ( $\lambda$  = 658 nm). The differential viscometer detector (Viscostar II, Wyatt Technology Inc., USA) was equipped with a four-capillary bridge design. The concentration of each eluted polysaccharide was determined using the differential refractive index detector (Optilab TrEX, Wyatt Technology Inc., U.S.A.). All collected data were analyzed using Astra V 6.0.6 software with the zimm plot (order 1) technique for molar-mass estimation and a differential refractive index increment of the polymer in the solvent used. A  $dn/dc$  classical value was employed for polysaccharides (0.146 mL g<sup>-1</sup>).<sup>38</sup>

**Statistical Treatment.** One-factor ANOVA and Tukey HSD posthoc tests were applied to establish the significance of differences between means ( $\alpha$  = 0.05). The data were analyzed with SPSS Statistics 21.0 Software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Fermentations.** All of the fermentations finished in 27 days. Mixed culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* (m-Td/Sc) presented a similar fermentation rate with regard to the pure culture of *S. cerevisiae* (p-Sc, considered as control). In the sequential culture of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* (s-Td/Sc), the addition of *S. cerevisiae* (day 6 of fermentation; Sc in graphics) produced a significant increase in the fermentation rate (Figure 1). These cocultures with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* as well as the fermentation control p-Sc were characterized by a lower



**Figure 1.** Fermentation kinetics of pure (p), mixed (m), and sequential (s) cultures in Malvar must with *T. delbrueckii* (Td) and *S. cerevisiae* (Sc) yeast strains. Values are the means from triplicate fermentations.

amount of residual sugar below 3 g L<sup>-1</sup>, which were therefore considered as dry wines. By contrast, *T. delbrueckii* in pure culture presented a lower fermentative capacity and did not consume the total quantity of sugars, finishing with 33.70 g L<sup>-1</sup> and 10.88% ethanol. It should also be highlighted the noticeably greater glycerol content found in the pure and sequential cultures of *T. delbrueckii* (7.14 and 5.28 g L<sup>-1</sup>, respectively) in comparison with the mixed culture and the control (2.87 and 3.12 g L<sup>-1</sup>, respectively).

**Purification of Polysaccharide and Oligosaccharide Fractions.** Malvar wines from pure, mixed, and sequential cultures with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* native yeasts were injected on Superdex 30-HR column in order to separate polysaccharides and oligosaccharides. The first two peaks, which eluted between 40 and 55 min, corresponds to the polysaccharide fraction; it is composed of polysaccharides rich in arabinose and galactose (PRAGs), mannoproteins (MPs), and rhamnogalacturonans type II (RG-II).<sup>6,39</sup> The polysaccharides rich in arabinose and galactose and rhamnogalacturonans come from the pecto-cellulosic cell walls of grape berries.<sup>4,7,13,16,35</sup> The mannoproteins are released from the yeast during alcoholic fermentation.<sup>35</sup> The fraction eluted between 56 and 93 min contained a complex mixture of small sugars which compose the oligosaccharide fraction of the different wines.<sup>4,13,15,16,19</sup> Because the winemaking process was the same, the profiles would indicate an important influence of yeast strain employed in the fermentation process, and the type of elaboration of the wines through pure, mixed, or sequential culture could also be influential. Sequential culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* presented the highest peaks during the purification process, which could suggest that the metabolism of both yeast strains have a cumulative effect (data not shown).

**Glycosyl-Linkage Composition of Polysaccharides Fraction.** The wine polysaccharides fraction was methylated, hydrolyzed, and analyzed for partially methylated alditol acetates by GC–MS. Their corresponding glycosyl-linkage composition is given in Table 1. Neutral sugars commonly present in wine polysaccharides<sup>35</sup> can be found in Malvar wines (Table 1). The predominance of arabinose, galactose, and mannose in the total colloids indicates that PRAGs from grape cell walls and mannoproteins from yeast cell walls were the



**Table 1.** Glycosyl-Linkage Composition (Mole Percentage) Of Polysaccharide Fractions Isolated from Malvar Wines Elaborated with Different Types of Inoculation of the Yeast Strains *T. delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889<sup>a</sup>

methyl ether	linkage	p-Sc <sup>c</sup>	p-Td <sup>c</sup>	m-Td/Sc <sup>c</sup>	s-Td/Sc <sup>c</sup>
2,3,4-rhamnose	terminal	2.9 ± 0.8	1.3 ± 0.1 <sup>d</sup>	2.2 ± 0.4	1.9 ± 0.2 <sup>d</sup>
3,4-rhamnose	2-linked	1.8 ± 0.5	0.8 ± 0.2 <sup>d</sup>	1.4 ± 0.4	1.1 ± 0.6
3-rhamnose	2,4-linked	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0 <sup>d</sup>
total rhamnose <sup>b</sup>		5.1 ± 1.4	2.4 ± 0.2 <sup>d</sup>	3.8 ± 0.2	3.1 ± 0.8 <sup>d</sup>
2,3,5-arabinose	terminal furanose	13.3 ± 3.3	11.0 ± 0.7	15.9 ± 3.5	12.2 ± 2.2
2,5-arabinose	3-linked	1.6 ± 0.4	0.6 ± 0.1 <sup>d</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>d</sup>
3,5-arabinose	2-linked	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
2,3-arabinose	5-linked	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.3
total arabinose <sup>b</sup>		15.7 ± 3.9	12.7 ± 0.9	17.0 ± 3.6	13.9 ± 2.8
2,3,4,6-galactose	terminal	3.3 ± 0.4	2.5 ± 0.6	3.0 ± 0.8	2.8 ± 0.6
2,3,4-galactose	6-linked	8.1 ± 0.6	8.8 ± 0.1	8.1 ± 0.1	7.1 ± 0.8 <sup>d</sup>
2,4,6-galactose	3-linked	5.6 ± 0.3	5.6 ± 0.1	5.9 ± 1.2	4.3 ± 0.9
2,4-galactose	3,6-linked	17.7 ± 1.3	16.3 ± 0.8	16.4 ± 2.1	13.1 ± 0.8 <sup>d</sup>
2-galactose	3,4,6-linked	4.2 ± 0.6	3.5 ± 0.4	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.7 <sup>d</sup>
total galactose <sup>b</sup>		38.9 ± 2.9	36.7 ± 1.8	36.6 ± 4.0	30.0 ± 2.4 <sup>d</sup>
2,3,4,6-glucose	terminal	1.4 ± 0.5	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0
2,3,4-glucose	6-linked	1.2 ± 0.9	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.8
total glucose <sup>b</sup>		2.6 ± 0.4	1.4 ± 0.4	0.8 ± 0.6 <sup>d</sup>	1.8 ± 0.9
2,3,4,6-mannose	terminal	11.8 ± 0.1	7.0 ± 0.1 <sup>d</sup>	12.3 ± 0.8	11.4 ± 0.4
3,4,6-mannose	2-linked	7.2 ± 0.8	29.7 ± 2.4 <sup>d</sup>	12.3 ± 3.9 <sup>d</sup>	29.3 ± 2.3 <sup>d</sup>
2,4,6-mannose	3-linked	8.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	7.8 ± 0.2	3.2 ± 0.7 <sup>d</sup>
2,3,6-mannose	4-linked	0.0 ± 0.0	2.6 ± 0.7 <sup>d</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3,4-mannose	2,6-linked	8.8 ± 1.6	6.1 ± 0.5	8.1 ± 2.8	6.5 ± 1.7
2,6-mannose	3,4-linked	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1 <sup>d</sup>
total mannose <sup>b</sup>		38.1 ± 3.3	47.4 ± 2.1 <sup>d</sup>	42.2 ± 7.6	51.7 ± 0.3 <sup>d</sup>
ratio terminal/branched		0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2

<sup>a</sup>Values are the mean ± SD of fermentations. <sup>b</sup>Relative molar percent of each parent sugar family (sum of ethers from one sugar type) within total sugars. <sup>c</sup>p-Sc: pure culture of *S. cerevisiae*; p-Td: pure culture of *T. delbrueckii*; m-Td/Sc: mixed culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*; s-Td/Sc: sequential culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*. <sup>d</sup>Means statistically different from the control (p-Sc),  $p < 0.05$ .

major macromolecules in Malvar wines regardless of the type of inoculation used with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*.

The major proportion of arabinosyl residues were present at the terminal nonreducing position (2,3,5-tri-O-methyl ether) under the furanose form, which may arise from both AGPs and arabinans. Arabinose linked →5 is characteristic of branched arabinans on the rhamnogalacturonan chain of the pectins (presence of 2- and 2,4-Rha).<sup>35</sup> Values obtained for →5 linked arabinose are similar to commercial Champagne wine studies<sup>40</sup> but noticeably lower than other red wines analyzed.<sup>13,16</sup> Arabinose linked at positions 2 and 3 has also been detected, with similar values regarding red wines, which originate from the AGPs of grapes.

It also contained all of the methyl ethers corresponding to the galactose linked at positions →3, →6, →3,6 and →3,4,6 linkages that are found in AGPs.<sup>8,10,35</sup> The presence of 3,6-linked galactose indicates that type II arabinogalactans are side chain components of the RG-I in Malvar wines.<sup>8,10</sup> The ratio of 3-linked galactose to 3,6-linked galactose residues (p-Sc, 1:3.1; p-Td, 1:2.9; m-Td/Sc, 1:2.7; s-Td/Sc, 1:3.0) indicated a highly branched molecule similar to the AGP isolated from Carignan wine<sup>8</sup> or Champagne wine.<sup>40</sup> Vidal et al.<sup>3</sup> reported that the addition of a mixture of AGPs and MPs have an influence on wine astringency and fullness. However, the physicochemical and sensorial properties related with PRAGs in wines need to be investigated.

Mannose residues were significantly predominant in those cultures where the *T. delbrueckii* CLI 918 strain has been used in the fermentation process. On the contrary, the pure culture

of *S. cerevisiae* presented a lower value of mannose residues (Table 1). Significant differences in molar percentage of mannose linked in →2, →3, →4 and →3,4 positions as well as in the nonreducing terminal were observed, particularly for the pure culture of *T. delbrueckii* and the sequential culture of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* compared to the pure culture of *S. cerevisiae*. The glycosyl-linkage compositions of mannoproteins isolated from the Malvar wine inoculated by pure culture of *S. cerevisiae* is in good agreement with the accepted structure for the glycosidic moiety of mannoproteins previously isolated from a Carignan red wine.<sup>35</sup> The structure of mannoproteins in these fractions consisted of a long 6-linked backbone, highly substituted on the 2-position with 2- and 3- linked mannose chains and attached to asparagine units in proteins. These structural characteristics are in agreement with the model proposed by Ballou<sup>41</sup> for mannoproteins from *Saccharomyces* and coincided with those typically found in yeast mannoproteins<sup>42</sup> or with those mannoproteins released into the wine.<sup>35</sup>

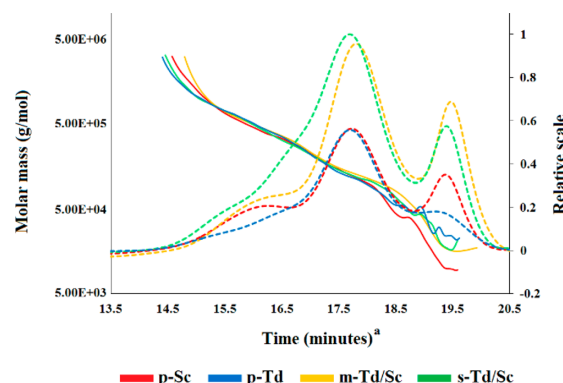
Nevertheless, it is important to highlight the structural differences of mannoproteins released by the *T. delbrueckii* strain in comparison with those released by the *S. cerevisiae* strain. In pure and sequential cultures with *T. delbrueckii*, the majority of mannoproteins were composed of short 2-linked mannose chains, attached to serine and threonine residues in the protein part (29.7% and 29.3% respectively), forming highly branched molecules. The ratio between the values (Table 1) exhibited for 2-linked mannose and terminal mannose in the pure culture of *T. delbrueckii* was equal to 4, so therefore, the chains of mannoproteins released by this non-*Saccharomyces*

strain contain four residues of mannose linked in  $\rightarrow 2$  for a terminal mannose. Mannose linked at the 4-position has only been observed in the pure culture of *T. delbrueckii* (Table 1), this 2,3,6-Man corresponds to the first mannose unit that it is 4-linked to the di-*N*-acetylchitobiose unit.<sup>41</sup> In the pure culture of *S. cerevisiae* (p-Sc) and in the pure culture of *T. delbrueckii* (p-Td), the structures of mannoproteins released into the wine are different (Table 1).

It was also observed in cocultures that the secreted mannoproteins will not be the same according to whether they are inoculated at the same time (m-Td/Sc: mixed culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*) or in a sequential manner (s-Td/Sc: sequential culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*). In mixed culture (m-Td/Sc), mannoproteins have a glycosidic structure similar to that obtained with a pure culture of *S. cerevisiae* (p-Sc). In the sequential culture (s-Td/Sc), the structure of mannoproteins is similar to that of the pure culture of *T. delbrueckii* (p-Td) (mannose linked in the 2-position, Table 1). Furthermore, both pure cultures presented a different ability to release polysaccharides into the wine, showing a higher ratio of polysaccharide release for *T. delbrueckii* than *S. cerevisiae*; these results are in agreement with the results obtained by Domizio et al.<sup>25</sup> In the case of sequential culture, the polysaccharide release from *T. delbrueckii* CLI 918 could be explained as the result of actively growing cells of this non-*Saccharomyces* yeast strain before the inoculation of *S. cerevisiae* CLI 889. In the case of the mixed culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*, the fermentation process seems to be dominated by *S. cerevisiae* as the results were similar to the control (p-Sc). In reference to polysaccharide production in mixed cultures, Cominiti et al.<sup>43</sup> observed a significant increase in the polysaccharide content only in the mixed fermentations of *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* at the inoculation ratios of 100:1 and 10 000:1. Other authors,<sup>44</sup> using a spectroscopic approach to evaluate the polysaccharide/mannoprotein ratio, have found differences depending on the yeast strain or species used.

Moreover, the relation of MPs with the retention of aromatic compounds and the increase of body and mouth feel in wines is well-known.<sup>3,45</sup> After physicochemical, aromatic, and sensorial analysis of these wines, the pure culture of *T. delbrueckii* and the sequential culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* contributed to increase the complexity and quality in the final wines. Specifically, the sequential culture was distinguished for its higher concentration of  $\beta$ -phenylethyl alcohol (rose aroma) and greater content of esters such as 2-phenylethyl acetate, ethyl isovalerate, and ethyl hexanoate. Sensorial analysis was carried out by a tasting panel; tasters valued pure and sequential cultures of *T. delbrueckii* as the best ones due to their fruity and flowery aroma, greater aroma intensity, and overall quality.<sup>32</sup>

**SEC–MALLS Analysis of Polysaccharide Fractions from Malvar Wines Elaborated with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* Strains.** The polysaccharide relative-index elution profiles show three principal populations (Figure 2). The concentration signal peaks are in the ranges 14.0–16.7 min for first population (P1), 16.7–18.8 min for second population (P2), and 18.8–20.5 min for third population (P3) (Figure 2, DRI signal). The molar mass of the eluting molecules decreased with increased elution volume, which is in agreement with the normal size-exclusion separation mechanism (Figure 2,  $M_w$  signal). Different molecular parameters such as molar mass, polydispersity index ( $M_w/M_n$ ), and intrinsic viscosity ( $[\eta]$ ) were measured in studied wines (Table 2). The molar mass appeared to be considerably greater for the pure culture of *T.*



**Figure 2.** SEC–MALLS chromatograms and weight-average molar-mass distributions of the polysaccharide fraction in pure (p), mixed (m), and sequential (s) cultures made with *T. delbrueckii* (Td) and *S. cerevisiae* (Sc) strains. Molar-weight distribution ( $M_w$ , g/mol, continuous line) and refractive index (DRI, relative scale, dashed line). (a) Peak 1: ranges 14.0–16.7 min (first population, P1); peak 2: ranges 16.7–18.8 min (second population, P2); peak 3: ranges 18.8–20.5 min (third population, P3).

**Table 2.** Parameters<sup>a</sup> Obtained For The Polysaccharides Isolated From Malvar White Wines Elaborated with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* Strains Using Different Types of Inoculation

wine sample <sup>b</sup>	peak <sup>c</sup>	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	$M_w/M_n$	intrinsic viscosity (mL/g)
p-Sc	1	539 000	422 200	1.31	43.59
	2	118 850	97 390	1.21	17.34
	3	18 975	16 595	1.14	9.36
p-Td	1	682 000	522 100	1.31	33.32
	2	133 500	108 200	1.23	16.30
	3	33 300	30 300	1.10	7.03
m-Td/Sc	1	679 350	453 600	1.50	51.99
	2	124 200	102 600	1.22	16.81
	3	26 490	22 990	1.15	8.32
s-Td/Sc	1	491 000	387 600	1.27	39.07
	2	129 100	115 550	1.12	17.99
	3	25 620	22 575	1.13	10.76

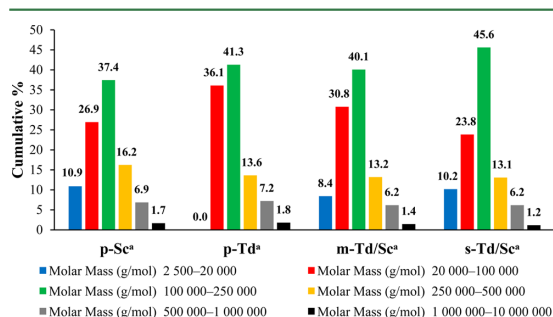
<sup>a</sup>Molar-mass distribution,  $M_w$  (molar weight),  $M_n$  (number-average mass),  $M_w/M_n$  (polydispersity index), and intrinsic viscosity ( $[\eta]$ ).

<sup>b</sup>Abbreviations related to the type of culture employed and the yeast strains are explained in Table 1. <sup>c</sup>Peak 1: ranges 14.0–16.7 min (first population, P1); peak 2: ranges 16.7–18.8 min (second population, P2); peak 3: ranges 18.8–20.5 min (third population, P3).

*delbrueckii* in all three populations (P1: 682 000 g/mol; P2: 133 500 g/mol; P3: 33 300 g/mol) in comparison with other cultures. This result was in good agreement with González-Royo et al.;<sup>26</sup> it described the presence of three populations of polysaccharides ( $HM_w$ : 144–1000 kDa;  $IM_w$ : 40–144 kDa;  $LM_w$ : 5–40 kDa) in white wine fermented by sequential inoculation with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*. The polydispersity index ( $M_w/M_n$ ) was, in general, lower in the P3 groups. All of the P1 groups showed higher values than previously reported in sparkling red wines.<sup>7</sup> These P1 groups (14.0–16.7 min) mainly correspond to mannoproteins whose molecular weights have been defined in the range from 50 000 to 560 000 g/mol.<sup>35</sup> The intrinsic viscosity was notably lower

for the pure and sequential cultures of *T. delbrueckii* in P1; it may be related to the higher proportion of branched mannoproteins found in these two cultures. Previous publications established the influence of the polysaccharides' degree of branching on the intrinsic viscosity.<sup>46</sup>

The molar-mass distribution analysis of the polysaccharide fractions from Malvar white wines elaborated with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* yeasts is shown in Figure 3. Regarding these



**Figure 3.** Distribution analysis determined by light scattering ( $dn/dc = 0.146 \text{ mL/g}$ ) of polysaccharide fractions isolated from Malvar white wines elaborated with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* yeast strains with different types of inoculation. (a) Abbreviations related to the type of culture employed and the yeast strains are explained in Table 1.

data, six delimited ranges among different wines can be observed (molar mass range: range 1 = 2500–20 000 g/mol; range 2 = 20 000–100 000 g/mol; range 3 = 100 000–250 000 g/mol; range 4 = 250 000–500 000 g/mol; range 5 = 500 000–1 000 000 g/mol; range 6 = 1 000 000–10 000 000 g/mol). The previous six ranges have been selected due to their correspondence with values obtained from different polysaccharide families by SEC analysis: RG-II monomer,  $M_w = 5000 \text{ g/mol}$ ; RG-II dimer,  $M_w = 10 000 \text{ g/mol}$ ;  $MP_{0c}$ ,  $M_w = 58 000 \text{ g/mol}$ ;  $AGP_2$ ,  $M_w = 165 000 \text{ g/mol}$ ;  $MP_{0w}$ ,  $M_w = 350 000 \text{ g/mol}$ ;  $MP_3$ ,  $M_w = 1 000 000 \text{ g/mol}$ .<sup>7,35</sup> Also,  $AGP_w$

with a molar mass around 145 000 g/mol, was found in Carignan red wine.<sup>35</sup>

In the pure culture of *T. delbrueckii* polysaccharide fractions, 0% of the mass can be observed in range 1, which corresponds to polysaccharides like mannoproteins of small molar mass (and mainly RG-II in the case of red wines). However, values in the range 1 in the pure culture of *S. cerevisiae* (11%) as well as in the mixed (8%) and sequential (10%) combinations presented values below those described in red wine.<sup>7</sup> Obvious differences are also observable concerning ranges 2 and 3. Pure culture of *T. delbrueckii* showed the highest values in the range 2 followed by mixed culture, pure culture of *S. cerevisiae*, and sequential culture (Figure 3). On the contrary, this sequential culture presented a higher percentage of mass in range 3, then the pure culture of *T. delbrueckii*, mixed culture, and pure culture of *S. cerevisiae*. In contrast, the percentage of mass in range 4, range 5 and range 6 were notably similar between four different types of cultures (Figure 3).

**Oligosaccharide Composition.** There are no published studies about the glycosyl composition of oligosaccharides in Malvar varietal wines. In addition, this is the first time that the glycosyl composition and characteristic ratios of oligosaccharides in pure, mixed, and sequential cultures with the native yeasts *T. delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889 have been analyzed, showing the corresponding results in Table 3. The wines studied contain most of the sugars which comprise wine carbohydrates.<sup>4,7,16,35</sup> These sugars are mainly rhamnose, arabinose, galactose, xylose, galacturonic acid, and glucuronic acid coming from the pecto-cellulosic cell walls of grapes. The presence of xylose and glucuronic and 4-O-Me glucuronic acid residues indicated that traces of hemicellulose might be solubilized from grape berry cell walls.<sup>13,47</sup> Other sugars such as mannose and glucose are released from yeast polysaccharides.

In our work, differences were observed in the predominance of several oligosaccharides between the types of cultures. However, the predominant oligosaccharides were glucose (20.0–40.9%), galacturonic acid (14.5–26.8%), xylose (11.1–

**Table 3.** Glycosyl Composition (Mole Percentage) and Characteristic Ratios of Oligosaccharides Isolated from Malvar Wines Elaborated with *T. delbrueckii* CLI 918 strain and *S. cerevisiae* CLI 889 Strain Using Different Inoculation Strategies<sup>a</sup>

	p-Sc <sup>c</sup>	p-Td <sup>c</sup>	m-Td/Sc <sup>c</sup>	s-Td/Sc <sup>c</sup>
Rha <sup>b</sup>	1.8 ± 0.9	2.9 ± 0.3 <sup>d</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>d</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>d</sup>
Fuc	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.1 <sup>d</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>d</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>d</sup>
Ara	8.2 ± 1.0	10.0 ± 2.2	10.1 ± 0.2	9.6 ± 0.4
Gal	4.3 ± 1.4	7.9 ± 0.4 <sup>d</sup>	6.6 ± 0.4 <sup>d</sup>	7.9 ± 0.3 <sup>d</sup>
Glc	40.9 ± 1.1	20.0 ± 1.4 <sup>d</sup>	21.6 ± 2.9 <sup>d</sup>	26.4 ± 0.9 <sup>d</sup>
Man	10.3 ± 0.3	12.4 ± 2.2	15.1 ± 1.6 <sup>d</sup>	15.3 ± 0.8 <sup>d</sup>
Xyl	11.1 ± 0.8	12.2 ± 2.8	15.3 ± 0.1 <sup>d</sup>	15.1 ± 0.3 <sup>d</sup>
Gal A	16.7 ± 1.8	26.8 ± 3.0 <sup>d</sup>	19.9 ± 0.7	14.5 ± 1.1
Glc A	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.8
4-O-MeGlc A	2.9 ± 0.2	3.4 ± 0.1 <sup>d</sup>	3.8 ± 0.0 <sup>d</sup>	2.8 ± 0.0
Xylitol ratio	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.4	2.5 ± 0.2 <sup>d</sup>
Ara/Gal	2.0 ± 0.4	1.3 ± 0.5 <sup>d</sup>	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1 <sup>d</sup>
Rha/Gal A	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0 <sup>d</sup>
(Ara+Gal)/Rha	7.9 ± 2.8	6.2 ± 0.4	6.2 ± 0.4	6.5 ± 0.4
Man/Glc	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.1 <sup>d</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>d</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Values are the mean ± SD of fermentations. <sup>b</sup>Rha, rhamnose; Fuc, fucose; Ara, arabinose; Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose; Xyl, xylose; Gal A, galacturonic acid; Glc A, glucuronic acid; 4-O-MeGlc A, 4-O-methyl glucuronic acid. <sup>c</sup>Abbreviations related to the type of culture employed and the yeast strains are explained in Table 1. <sup>d</sup>Means statistically different from the control (p-Sc),  $p < 0.05$ .

15.3%), mannose (10.3–15.3%), arabinose (8.2–10.1%), and galactose (4.3–7.9%). 4-O-Me glucuronic acid (2.8–3.8%), rhamnose (1.8–2.9%), and xylitol (1.9–2.5%) were also found in all cultures but in lower quantities. The smallest quantities of oligosaccharides corresponded to glucuronic acid (1.1–1.8%) and fucose (1.4–1.6%), which is in agreement with results obtained in red and white still wines<sup>4,13,14</sup> and sparkling wines.<sup>7</sup> As shown in Table 3, the glucose content released into the medium was higher (40.9%) in the pure culture of *S. cerevisiae* (culture considered as control) compared to the other samples. It could be possible that the strains used in this work release a small part of their underlying layer composed of  $\beta$ -glucans, in addition to the external mannoprotein layer.<sup>20</sup>

The galacturonic acid content in the pure culture of *T. delbrueckii* could be highlighted. The high value of galacturonic acid has been reported in red wines before, and it has been explained by differences in the pectin composition and in the natural pectinase activities present in grape skins.<sup>4,7,13,16</sup> In our case, it could be possible that the pectinase activity showed by the *T. delbrueckii* CLI 918 strain<sup>28</sup> could also influence this galacturonic acid value. It is well known that pectinase enzymes have a notable influence on technological and sensorial properties of wines.<sup>48</sup>

Mannose residues were higher in wines elaborated with different combinations of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*, in mixed and sequential inoculations (Table 3). Mannose and glucose residues are mainly released from yeast cell walls; our findings regarding these two oligosaccharides are similar to those found by Quijada-Morín et al.<sup>4</sup> and greater than those obtained by other authors,<sup>7,13</sup> probably due to differences in maturity stages between cultivars at time of the harvest or to different winemaking conditions.

The oligosaccharides coming from grape cell walls presented similar proportions in respect to those described in Chardonnay and Grignolino wines,<sup>14</sup> with the exception of galacturonic acid and mannose content, which was considerably higher in Malvar wines. Oligosaccharides such as arabinose, rhamnose, and galactose were larger in Carignan,<sup>13</sup> Cabernet Sauvignon, Syrah, and Monastrell<sup>16</sup> red wines in comparison with Malvar white wines. It could be related to longer contact between grape skins and must during the elaboration of red wines than during the production of white ones.

In order to know the oligosaccharide sugar structures, several characteristic ratios have been calculated (Table 3): arabinose to galactose (Ara/Gal), rhamnose to galacturonic acid (Rha/Gal A), arabinose+galactose to rhamnose (Ara+Gal/Rha), and mannose to glucose (Man/Glc).

The ratio Ara/Gal is characteristic of the wine PRAGs.<sup>38,47</sup> The value of this ratio has been previously described in red wines, close to 1.<sup>48</sup> Other authors obtained ratios 2-fold higher in Carignan and Merlot red wines<sup>13</sup> and in Tempranillo sparkling wines.<sup>7</sup> In our work, this ratio showed significantly lower values in the case of sequential culture of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* and pure culture of *T. delbrueckii* compared to the control (Table 3). The higher ratio Ara/Gal in *S. cerevisiae* pure culture and mixed culture suggests a release of arabinose or oligosaccharides rich in arabinose coming from pectic framework. By contrast, it could be suggested that sequential inoculation produced a slight degradation of PRAG structures. This PRAG degradation has been described previously during post maceration and malolactic fermentation<sup>49</sup> and during wine aging of lees by a partial dearabinosylation.<sup>47</sup> Moreover,

Champagne wines presented a much lower ratio Ara/Gal (0.18) in comparison with red wines.<sup>40</sup>

The Rha/Gal A ratio provides information on the relative richness of the wine oligosaccharides in homogalacturonans versus rhamnogalacturonans.<sup>50</sup> There is a slight difference in the sequential culture. These low ratios (between 0.1–0.2) for all the samples would suggest homogalacturonan predominance in oligosaccharides from Malvar wines. The results obtained were lower than those found in red still wines<sup>4,13,16,19</sup> but higher than the results obtained in red sparkling wines.<sup>7</sup> This apparent discrepancy could be explained by the fact that grape variety could impact wine oligosaccharide structure, as demonstrated by Apolinar-Valiente et al.<sup>16</sup>

It is assumed that most of the Ara and Gal residues are associated with pectin hairy regions. Therefore, the (Ara+Gal/Rha) ratio was calculated to estimate the relative importance of the neutral side chains to the rhamnogalacturonan backbone. This ratio was considerably higher in the pure culture of *S. cerevisiae* in comparison with the pure culture of *T. delbrueckii*, and mixed and sequential cultures (Table 3). It might be concluded that Malvar white wines elaborated from different *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* combinations contain more structures from the hairy regions of pectins (rhamnogalacturonan-like structures carrying neutral lateral chains) as a result of breakdown of grape cell wall berries by pectinases. This degradation could be favored by pectinase activity presented by *T. delbrueckii* CLI 918 strain.<sup>28</sup> Different values for this ratio have been found in other grape varieties, including 2.8 and 3.1 in Carignan and Merlot oligosaccharides,<sup>13</sup> 2.8 for Syrah oligosaccharides, 4.7 in Cabernet Sauvignon grape variety and 5.1 in Monastrell variety.<sup>16</sup> Also, Martínez-Lapuente et al.<sup>7</sup> showed the change of (Ara+Gal)/Rha ratio in Tempranillo sparkling wines during the aging.

The Man/Glc ratio has been related to the effectiveness of mannoproteins for protein stabilization in white wines, being more effective when this proportion is higher.<sup>45</sup> In our case, glucose was largely the major residue sugar (20.0–40.9%), whereas mannose represented smaller proportions (10.3–15.3%). Glucose is the prevalent sugar in grape berries<sup>9</sup> since it is the main component of cellulose and hemicellulosic xyloglucans. Furthermore, the presence of glucose in wines may also be related to microbial cell walls (*Botryotinia fuckeliana*, *Oenococcus oeni*) or condensed anthocyanins.<sup>39</sup> In this work, grapes were harvested in good sanitary conditions. Malvar white grapes did not contain anthocyanins, and malolactic fermentation was not conducted. Therefore, the glucose content in these Malvar wines would come from yeast glucans released during the fermentation. Because the different chemical composition indicated by the Man/Glc ratio for oligosaccharides could determine a different functional effect on the wine, further analyses will be necessary to determine a possible correlation on the wine attributes derived from the different mannoproteins released through pure, mixed, or sequential culture of *T. delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889.

Taking into account that the grape variety, maturity stage, and grape processing were equal, the results of this study highlight that yeast strain and type of inoculation have a significant impact on wine carbohydrate composition and structure. Regarding the composition of the polysaccharide fraction, mannose residues from MPs were significantly predominant in those cultures where *T. delbrueckii* was present in the fermentation process, whereas galactose residues from



PRAGs presented higher values when a pure culture of *S. cerevisiae* was employed, indicating that *S. cerevisiae* released less mannoproteins than *T. delbrueckii*. Concerning the molecular parameters, the molar mass appeared considerably higher for pure culture of *T. delbrueckii* in comparison with other cultures. Also, there were variations with regard to the intrinsic viscosity, which depended on the population observed by RI technique. Moreover, the molar-mass distribution of the polysaccharide fractions from Malvar white wines also showed obvious changes and relied on the yeast strain and type of inoculation used. In regards to the polysaccharide fractions in pure culture of *T. delbrueckii*, 0% of the molar mass can be observed in the range between 2500 and 20 000 g/mol, whereas the control (p-Sc) and the cocultures presented values between 8.4 and 10.9% for this range. Clear differences were also observable in the range between 20 000 and 100 000 g/mol and the range between 100 000 and 250 000 g/mol. The analysis of Malvar wines has also revealed that the oligosaccharide composition and structure could be significantly influenced by the types of cultures.

In summary, our results provide relevant information about the polysaccharides and oligosaccharides released from the cell wall of Malvar grapes and the carbohydrates released from the cell wall of different yeast strains through pure, mixed, or sequential cultures of *T. delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889. These findings, about the use of different types of cultures, aim to improve the quality of wines from D.O. "Vinos de Madrid", highlighting especially sequential cultures to produce larger amounts of mannoproteins, enhancing the complexity and quality of Malvar wines. Analysis should be carried out to deepen our knowledge concerning the capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast strains to release mannoproteins, which could be considered a selection criterion for wine elaboration because of their reported contribution to wine quality.

#### AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Author

\*Tel.: +34 918879486; Fax: +34 918879492; E-mail: [teresa.arroyo@madrid.org](mailto:teresa.arroyo@madrid.org).

##### ORCID

Teresa Arroyo: 0000-0001-5902-1736

Julia Crespo: 0000-0002-2341-3452

##### Funding

The authors would like to acknowledge the INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria) for the funding provided for this study through the Project RM2010-00009-C03-01. M.G. acknowledges the IMIDRA for her grant, and also thanks the Erasmus+ program for the financing of her predoctoral fellowship.

##### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ABBREVIATIONS USED

PRAGs, polysaccharides rich in arabinose and galactose; AGs, type II arabinogalactans; AGPs, type II arabinogalactan-proteins; RG-I, rhamnogalacturonans type I; RG-II, rhamnogalacturonans type II; MPs, mannoproteins; TMS, per-O-trimethylsilylated methyl glycoside; HRSEC, high-resolution size-exclusion chromatography; GC-EI-MS, gas chromatography electron ionization mass spectrometry; SEC-MALLS, size-exclusion chromatography–multiangle laser-light scattering

#### REFERENCES

- (1) Gerbaud, V.; Gabas, N.; Laguerie, C.; Blouin, J.; Vidal, S.; Moutounet, M.; Pellerin, P. Effect of wine polysaccharides on the nucleation of potassium hydrogen tartrate in model solutions. *Trans. Inst. Chem. Eng.* **1996**, *74*, 782–790.
- (2) Dufrechou, M.; Doco, T.; Poncet-Legrand, C.; Sauvage, F. X.; Vernhet, A. Protein/Polysaccharide interactions and their impact on haze formation in white wines. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10042–10053.
- (3) Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.* **2004**, *85*, 519–525.
- (4) Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Doco, T.; Escribano-Bailón, M. T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chem.* **2014**, *154*, 44–51.
- (5) Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **2002**, *16*, 17–23.
- (6) O'Neill, M. A.; Warrenfeltz, D.; Kates, K.; Pellerin, P.; Doco, T.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 22923–22930.
- (7) Martínez-Lapuente, L.; Apolinar-Valiente, R.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.; Pérez-Magariño, S.; Williams, P.; Doco, T. Influence of grape maturity on complex carbohydrate composition of red sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, S020–S030.
- (8) Pellerin, P.; Vidal, S.; Williams, P.; Brillouet, J. M. Characterization of S-type-II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic-acid content. *Carbohydr. Res.* **1995**, *277*, 135–143.
- (9) Vidal, S.; Williams, P.; O'Neill, M. A.; Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 315–323.
- (10) Pellerin, P.; Doco, T.; Vidal, S.; Williams, P.; Brillouet, J. M.; O'Neill, M. A. Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* **1996**, *290*, 183–197.
- (11) Del Barrio-Galán, R.; Pérez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Williams, P.; Doco, T. Effect of aging on lees and of three different dry yeast derivative products on verdejo white wine composition and sensorial characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12433–12442.
- (12) Ciezack, G.; Hazo, L.; Chambat, G.; Heyraud, A.; Lonvaud-Funel, A.; Dols-Lafargue, M. Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 499–509.
- (13) Ducasse, M. A.; Williams, P.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Doco, T. Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 747–754.
- (14) Bordiga, M.; Travaglia, F.; Meyrand, M.; German, J. B.; Lebrilla, C. B.; Coisson, J. D.; Arlorio, M.; Barile, D. Identification and characterization of complex bioactive oligosaccharides in white and red wine by a combination of mass spectrometry and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3700–3707.
- (15) Doco, T.; Williams, P.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Sommerer, N. Complex carbohydrates of red wine: Characterization of the extreme diversity of neutral oligosaccharides by ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 671–682.
- (16) Apolinar-Valiente, R.; Romero-Cascales, I.; Williams, P.; Gomez-Plaza, E.; Lopez-Roca, J. M.; Ros-García, J. M.; Doco, T. Oligosaccharides of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines. *Food Chem.* **2015**, *179*, 311–317.
- (17) Darvill, A. G.; Albersheim, P. Phytoalexins and their elicitors-A defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1984**, *35*, 243–275.

- (18) Babbar, N.; Dejonghe, W.; Gatti, M.; Sforza, S.; Elst, K. Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 594–606.
- (19) Apolinar-Valiente, R.; Williams, P.; Mazerolles, G.; Romero-Cascales, I.; Gómez-Plaza, E.; López-Roca, J. M.; Ros-García, J. M.; Doco, T. Effect of enzyme additions on the oligosaccharide composition of Monastrell red wines from four different wine-growing origins in Spain. *Food Chem.* **2014**, *156*, 151–159.
- (20) Giovani, G.; Rosi, I.; Bertuccioli, M. Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *160*, 113–118.
- (21) Ciani, M.; Comitini, F.; Mannazzu, I.; Domizio, P. Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* **2010**, *10*, 123–133.
- (22) Rojas, V.; Gil, J. V.; Piñaga, F.; Manzanares, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *86*, 181–188.
- (23) King, A.; Dickinson, J. R. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **2000**, *16*, 499–506.
- (24) Bely, M.; Stoeckle, P.; Masneuf-Pomarède, I.; Dubourdieu, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *122*, 312–320.
- (25) Domizio, P.; Liu, Y.; Bisson, L. F.; Barile, D. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol.* **2014**, *43*, 5–15.
- (26) González-Royo, E.; Pascual, O.; Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Esteve-Zarzoso, B.; Mas, A.; Canals, J. M.; Zamora, F. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *240*, 999–1012.
- (27) Ganga, M. A.; Martínez, C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 76–83.
- (28) Cordero-Bueso, G.; Esteve-Zarzoso, B.; Cabellos, J. M.; Gil-Díaz, M.; Arroyo, T. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *236*, 193–207.
- (29) Tello, J.; Cordero-Bueso, G.; Aporta, I.; Cabellos, J. M.; Arroyo, T. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 302–315.
- (30) Cordero-Bueso, G.; Esteve-Zarzoso, B.; Gil-Díaz, M.; García, M.; Cabellos, J. M.; Arroyo, T. Improvement of Malvar wine quality by use of locally-selected *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Fermentation* **2016**, *2*, 7.
- (31) García, M.; Greetham, D.; Wimalasena, T. T.; Phister, T. G.; Cabellos, J. M.; Arroyo, T. The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 215–233.
- (32) García, M.; Arroyo, T.; Crespo, J.; Cabellos, J. M.; Esteve-Zarzoso, B. Use of native non-*Saccharomyces* strain: A new strategy in D.O. “Vinos de Madrid” (Spain) wines elaboration. *Eur. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *5*, 1–31.
- (33) Hakomori, S. I. A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* **1964**, *55*, 205–208.
- (34) Harris, P. J.; Henry, R. J.; Blakeney, A. B.; Stone, B. A. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **1984**, *127*, S9–73.
- (35) Vidal, S.; Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 439–447.
- (36) Sweet, D. P.; Shapiro, R. H.; Albersheim, P. Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* **1975**, *40*, 217–225.
- (37) Doco, T.; O'Neill, M. A.; Pellerin, P. Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EL-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *46*, 249–259.
- (38) Redgwell, R. J.; Schmitt, C.; Beaulieu, M.; Curti, D. Hydrocolloids from coffee: Physicochemical and functional properties of an arabinogalactan-protein fraction from green beans. *Food Hydrocolloids* **2005**, *19*, 1005–1015.
- (39) Doco, T.; Quéllec, N.; Moutounet, M.; Pellerin, P. Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 25–32.
- (40) Doco, T.; Williams, P. Purification and structural characterization of a type II arabinogalactan-protein from Champagne wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2013**, *64*, 364–369.
- (41) Ballou, C. E. Yeast cell wall and cell surface. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*; Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J. R., Eds.; Cold Spring Harbor Monograph Series; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1982; pp 335–360.
- (42) Saulnier, L.; Mercereau, T.; Vezinhet, F. Mannoproteins from flocculating and non-flocculating *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *54*, 275–286.
- (43) Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 873–882.
- (44) Moore, J. P.; Zhang, S. L.; Nieuwoudt, H.; Divol, B.; Trygg, J.; Bauer, F. F. A multivariate approach using attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy to measure the surface mannoproteins and  $\beta$ -glucans of yeast cell walls during wine fermentations. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10054–10063.
- (45) Ribeiro, T.; Fernandes, C.; Nunes, F. M.; Filipe-Ribeiro, L.; Cosme, F. Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties. *Food Chem.* **2014**, *159*, 47–54.
- (46) Weaver, L.; Yu, L. P.; Rollings, J. E. Weighted intrinsic viscosity relationships for polysaccharide mixtures in dilute aqueous solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **1988**, *35*, 1631–1637.
- (47) Doco, T.; Williams, P.; Pauly, M.; O'Neill, M. A.; Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *53*, 253–261.
- (48) Doco, T.; Williams, P.; Cheynier, V. Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6643–6649.
- (49) Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10720–10728.
- (50) Arnous, A.; Meyer, A. S. Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3611–3619.





## 4. DISCUSIÓN GENERAL





La finalidad principal de este trabajo es la de poner a disposición del sector vitivinícola cepas de levaduras autóctonas de los géneros *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* capaces de incidir positivamente sobre la calidad de los vinos, ya sea empleadas como cultivos puros iniciadores o bajo diferentes estrategias de co-inoculación. De manera simultánea, se busca que las cepas candidatas posean buenas aptitudes de adaptación a diferentes condiciones de estrés fermentativo propias de zonas de producción de climas cálidos, respetando la calidad organoléptica del producto final.

Actualmente, ante un mercado globalizado internacional cada vez más competitivo, y la demanda por parte de los consumidores de nuevos estilos de vinos con la mejor relación calidad/precio, se imponen al sector productivo regional nuevos retos que requieren de nuevas estrategias (Bisson et al., 2002; Pretorius y Høj, 2005). Estudios ecológicos muestran que la diversidad de levaduras está influenciada de manera significativa por las características tecnológicas y geográficas de cada región donde se elaboran los vinos. Así, el uso de cultivos iniciadores desarrollados con levaduras autóctonas aisladas de una región concreta, seleccionadas especialmente por sus aptitudes enológicas y su adaptación a las condiciones climáticas de la zona de producción, surge como una herramienta útil para la diferenciación, diversificación y mejora de la calidad de los vinos. Por ello, y en previsión a los cambios en la composición de la uva, en la microbiología, en la química y en aspectos sensoriales que están surgiendo en el vino debido al cambio climático, la selección de levaduras autóctonas puede además ayudar a aliviar este efecto en zonas de clima cálido.

Otra forma de producir vinos con características especiales y atractivas para el consumidor es el uso de manera controlada de levaduras no-convencionales en el proceso de fermentación, lo que ha provocado un interés creciente en la elaboración de vino, simulando la fermentación espontánea, para obtener vinos con más aroma, sabor, y de mayor complejidad. Las levaduras no-*Saccharomyces* presentan características metabólicas propias, como son la capacidad de secretar enzimas y metabolitos relacionados con el aroma primario y secundario en vinos, producción de baja acidez volátil, aumento de glicerol, liberación de manoproteínas, incremento de la estabilidad de color o reducción del contenido en etanol, que afectan de manera directa a las características organolépticas del vino (Ciani et al., 2010; 2014). Por tanto, debido a su positiva contribución a la calidad del vino se ha postulado el uso de cultivos mixtos (co-inóculos) o cultivos secuenciales de *S. cerevisiae* o cepas estrechamente relacionadas, con una o más cepas de levaduras no-*Saccharomyces*.

Por estos motivos, una de las metas perseguidas en este trabajo ha sido la de conocer la aptitud de levaduras autóctonas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* aisladas en viñedos y bodegas de la D.O. “Vinos de Madrid” de crecer bajo diferentes condiciones de estrés fermentativo debidas a presión osmótica, etanol y pH.

De la aplicación de la tecnología de fenotipo microarray, se ha conocido el comportamiento y la adaptación bajo situaciones de estrés inherentes a la fermentación de 94 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de seis viñedos y bodegas localizadas en las áreas de Arganda, Navalcarnero y San Martín (Tello et al., 2012), todas ellas pertenecientes a la D.O. “Vinos de Madrid”. Además, se han estudiado 29 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en base a su potencial biotecnológico (Arroyo et al., 2010; Cordero-Bueso et al., 2013); 18 de ellas pertenecientes a la colección de levaduras del IMIDRA y 11 procedentes de fermentaciones espontáneas de la variedad de uva autóctona Malvar (Cordero-Bueso et al., 2013), también incluidas en la colección.

Bajo condiciones de estrés osmótico, producidas en el ensayo por concentraciones de 20% y 30% de sorbitol, las levaduras activan diferentes estrategias que lo contrarresten. El principal mecanismo mostrado en levaduras es la producción y acumulación de glicerol (Hohmann, 2002). Se ha podido observar que tres de las cepas de *S. cerevisiae* capaces de crecer a altas concentraciones de sorbitol (G490, G505 y G2) han producido glicerol en una concentración notablemente mayor que la cepa empleada como control (CLI 889) en las fermentaciones elaboradas a partir de un mosto con alta concentración de azúcares (230 g L<sup>-1</sup>). Esta capacidad de producir glicerol puede ser considerada como un criterio de selección de las levaduras para su aplicación en la industria del vino. Otro subproducto relacionado con la adaptación a un ambiente con alta concentración de azúcares es la producción por parte de las levaduras de ácido acético hasta niveles inaceptables en el vino, a fin de mantener el balance redox intracelular (Remize et al., 2003), por lo tanto es necesario buscar levaduras que no eleven la concentración de este compuesto en condiciones hiperosmóticas. Así entre las cepas ya mencionadas, G490 y G505 producen una acidez volátil baja (0,3 y 0,5 g L<sup>-1</sup>, respectivamente), en contraposición con la cepa G2 que produce valores de acidez volátil elevados (0,8 g L<sup>-1</sup>) aunque inferiores a los límites aceptados legalmente (Bely et al., 2005). Entre las cepas de *S. cerevisiae* más resistentes a estrés osmótico, capaces de tolerar valores de 30% de sorbitol, destacan G490, G520, G521 y G505, que fueron aisladas mayoritariamente en la bodega F situada en la subzona de Arganda, caracterizada por elaborar vinos en condiciones ecológicas.

A su vez, una fermentación con alta concentración de azúcares en el mosto conlleva a una alta producción de etanol en el vino final, así también es necesario poseer levaduras que presenten la capacidad de crecer a altas concentraciones de este compuesto tóxico para las células. El grado alcohólico en vinos comerciales normalmente oscila entre 9% y 15% (v/v). No obstante, en regiones soleadas y cálidas, el contenido medio en alcohol se ha incrementado un 2% (v/v) durante los últimos 30 años. En zonas donde normalmente no era frecuente elaborar vinos con concentraciones de etanol superiores a 14% (v/v) antes de los años 80, ahora es posible encontrar vinos con una concentración de alcohol en torno a 16% (v/v) (Varela et al., 2015). Esto puede propiciar problemas microbiológicos, tecnológicos, sensoriales y económicos para el sector vitivinícola. Como recoge el subapartado 3.2. del trabajo presentado, las cepas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* han sido sometidas a concentraciones crecientes de etanol (5%, 8%, 13% y 18% v/v). En base a lo esperado, *Saccharomyces* fue la especie más tolerante a este compuesto en general; no obstante, se observó variación entre las cepas frente a la concentración de etanol. Todas las cepas ensayadas fueron capaces de crecer en presencia del 5% y 8% de etanol, aunque sólo ocho cepas de *S. cerevisiae* crecieron en presencia de 13% de etanol. Las cepas capaces de crecer en un ambiente con 13% de etanol fueron aisladas mayoritariamente en etapas finales de la fermentación en bodega (fase fermentativa IV), salvo G516 y G491 que se aislaron en la fase inicial y media de la fermentación en bodega, respectivamente (fases II y III). El hecho de que estas cepas no aparezcan al final de la fermentación podría deberse a un mayor requerimiento nutricional y a la competencia por los nutrientes con otras cepas presentes en el medio. Aunque las demandas de nitrógeno dependen en gran medida de la cepa de levadura, se sabe que el éxito de la fermentación está condicionado por el contenido en nitrógeno disponible en el medio y tiene influencia tanto en la velocidad como en la finalización del proceso de fermentación (Taillandier et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2012). Aun así, la cepa G516 mostró una cinética fermentativa rápida (15 días) y la cepa G491, a pesar de presentar fenotipo killer, desaparece en las primeras etapas de fermentación en bodega, cuando la competencia por los nutrientes es crítica.

En cuanto a los valores de pH, se ha descrito que valores de pH bajos afectan a la estabilidad microbiana y valores de pH elevados conllevan un posible riesgo de contaminaciones microbianas en las primeras etapas de la fermentación. En nuestro trabajo, se ensayó el comportamiento de las levaduras a dos valores de pH que se han detectado en

mostos de la región (pH 3,0 y pH 3,4), con el resultado general de que todas las cepas fueron metabólicamente activas a ambos valores. Varios autores han documentado la tolerancia de *Saccharomyces* a pH entre 2,8 y 3,2 (Belloch et al., 2008) y el bajo impacto que produce el pH en el ambiente de fermentación para *Saccharomyces uvarum* (Serra et al., 2005).

Finalmente, se identificaron 12 cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas por mostrar mayor tolerancia a las condiciones de estrés ensayadas (presión osmótica, etanol y pH). Estas cepas provenían de diferentes zonas de la región, siendo las cepas más resistentes a presión osmótica y a etanol más abundantes en las bodegas ecológicas, en concreto la bodega F de la subzona de Arganda y la bodega E de la subzona de San Martín. En general, las cepas de estas subzonas presentaron mayor tolerancia a concentraciones del 13% de etanol en el medio. Estos resultados parecen ser consistentes con la hipótesis de que las cepas están adaptadas a las condiciones de crecimiento presentes en el ambiente en el cual están especializadas (Belloch et al., 2008).

Además, con estas cepas resistentes se elaboraron vinos de la variedad Malvar, para confirmar su capacidad de producir vinos de calidad. En la evaluación de la contribución al aroma de los compuestos volátiles del vino se utilizó el valor OAV (valor de actividad olfativa); con valores de  $OA\bar{V} \geq 1$ , se considera que el compuesto tiene una contribución activa en el aroma global. Los resultados del análisis sensorial llevado a cabo por el panel de catadores del IMIDRA, experimentados en la cata de vinos blancos de la D.O. “Vinos de Madrid”, seleccionaron como preferentes los vinos elaborados con las cepas G464 (Bodega E), G1 (Bodega A) y G491 (Bodega E), ambas bodegas con un sistema ecológico de producción de vino. Los vinos elegidos destacaron en base a los descriptores del aroma frutal y floral, y por una mejor calidad global, lo que guarda relación con el contenido en estas cepas de  $\beta$ -feniletanol y ésteres como butirato de etilo, isovalerato de etilo, isobutirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y acetato de 2-feniletilo, con valores de OAV superiores a 1 para estos compuestos. Entre las cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas por mostrar resistencia a las diferentes condiciones de estrés fermentativo, los alcoholes superiores alcohol isoamílico e isobutanol sobrepasaron sus límites de percepción y por lo tanto contribuyen al aroma alcohólico de los vinos. Los valores de alcoholes superiores por debajo de 300 mg L<sup>-1</sup> están dentro de los valores deseables en los vinos (Pretorius, 2000). Rankine (1967) describió que la capacidad de producir alcoholes superiores durante la fermentación es una característica dependiente de cepa, y encontró valores en

fermentaciones con distintas cepas de *S. cerevisiae* de *n*-propanol entre 13 y 106 ppm, de isobutanol entre 9 y 37 ppm y de alcohol isoamílico entre 115 y 262 ppm, rangos no muy distantes a los obtenidos en las fermentaciones con las levaduras *S. cerevisiae* más resistentes a estrés.

En cuanto a las levaduras no-*Saccharomyces* que mostraron buena tolerancia a las situaciones de estrés generadas, destacan cepas de las especies: *S. pombe*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*, *C. stellata* y *M. pulcherrima*. Diferentes estudios citan el empleo de *T. delbrueckii* en cultivo mixto en fermentaciones de mosto botritizado con elevados contenidos de azúcar, del orden de 350 a 450 g L<sup>-1</sup> (Laffon-Lafourcade et al., 1981; Bely et al., 2008). También, la especie de levadura *M. pulcherrima* se ha aislado en uvas empleadas para la producción de ice wine o vino de hielo (Chamberlain et al., 1997) y en vino botritizado o de podredumbre noble (Antunovics et al., 2003). En la elaboración de ambos tipos de vino, las uvas empleadas se recolectan sobremaduras, parcial o totalmente desecadas, debido a la evaporación del agua a través de las lesiones producidas en la piel de la baya lo que determina la concentración de azúcar en el fruto. La habilidad de *M. pulcherrima* para sobrevivir bajo condiciones de baja actividad de agua (Rousseau y Donèche, 2001) se considera un factor favorable para su prevalencia en uvas destinadas a la elaboración de estos vinos. Otros autores han mostrado la habilidad de cepas de *Candida apicola* y *Candida zemplinina* de crecer en presencia de un 14% v/v de etanol (Tofalo et al., 2009). Del mismo modo, *S. pombe* fue clasificada como levadura con alta tolerancia al etanol en un ensayo realizado por Ranganathan y Bhat (1958), en coincidencia con nuestros resultados donde la cepa de *S. pombe* ensayada fue la especie de no-*Saccharomyces* que presentó mayor tolerancia a la presencia de concentraciones de 8% de etanol. Koukkou et al. (1990; 1993) comprobaron que el aumento en los ácidos grasos de la pared celular parece ser la causa principal de la respuesta adaptativa de las células de *S. pombe* en presencia de etanol.

Para la aplicación de los co-cultivos destinados a la mejora de la calidad de los vinos Malvar de la D.O. “Vinos de Madrid”, las cepas autóctonas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* ensayadas bajo diferentes estrategias de inoculación (cultivo puro, cultivo mixto y cultivo secuencial), además de presentar buena tolerancia a las diferentes condiciones de estrés, previamente, ya habían sido seleccionadas en base a sus buenas aptitudes enológicas y biotecnológicas como se recoge en el Anexo II. En estas elaboraciones fueron empleadas seis cepas de levaduras no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*



CLI 918, *S. pombe* CLI 1085 y CLI 1079, *C. stellata* CLI 920, *M. pulcherrima* CLI 457 y *L. thermotolerans* 9-6C) y una cepa de *S. cerevisiae* CLI 889, todas ellas autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid”. Se realizaron experimentos a escala de laboratorio con los cultivos puros y mixtos de la cepa de *Saccharomyces* y cada una de las seis cepas no-*Saccharomyces* en mosto estéril de la variedad Malvar, para comprobar las características organolépticas aportadas al vino elaborado. Las mejores combinaciones (cultivo mixto o cultivo secuencial) fueron posteriormente estudiadas a escala piloto en la bodega experimental del IMIDRA, esta vez, en condiciones no estériles y estudiando la evolución de las cepas inoculadas gracias a la técnica de qPCR junto con el diseño de cebadores específicos. Gracias al seguimiento por PCR cuantitativa a tiempo real de la evolución de las poblaciones durante la fermentación, se ha analizado la dinámica de las cinco levaduras no-*Saccharomyces* en las fermentaciones con *S. cerevisiae*. De los resultados obtenidos se confirma que las especies no-*Saccharomyces* estaban presentes durante todo el proceso de fermentación, si bien *S. cerevisiae* fue la levadura más abundante a final de fermentación en cada una de las asociaciones ensayadas. Diferentes mecanismos se han descrito para explicar la dominancia de *S. cerevisiae* sobre otros competidores durante la fermentación del vino, destacando, el contacto célula a célula (Nissen et al., 2003); la competencia por nutrientes (Taillandier et al., 2014; Kemsawasd et al., 2015; Lleixà et al., 2016); la secreción de compuestos tóxicos (Pérez-Nevado et al., 2006; Branco et al., 2015; Ramírez et al., 2015; Wang et al., 2016); o los cambios en el medio (Goddard, 2008; Salvadó et al., 2011). Estos efectos causados por la producción de metabolitos por *S. cerevisiae* y los cambios en el medio podrían contribuir a explicar la causa de la disminución de las poblaciones de *M. pulcherrima* y *C. stellata* así como al incremento y persistencia durante la fermentación de *T. delbrueckii*, *S. pombe* y *L. thermotolerans*. Aunque, hay que tener presente que la persistencia de estas tres últimas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* puede estar relacionada con su mayor poder fermentativo observado previamente a escala de laboratorio (subapartado 3.3 de Resultados y Discusión). Este hecho se observa claramente en relación con la cantidad de alcohol producida por las especies de levaduras (Lopes et al., 2006) y, por consiguiente, guarda relación con su tolerancia al etanol (Ciani et al., 2016).

Los resultados de los trabajos realizados permiten corroborar que las estrategias de inoculación seleccionadas entre las combinaciones de las cepas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* comparadas con el ensayo control, cultivo puro de *S. cerevisiae* CLI 889,

aportan mayor calidad a los vinos Malvar, independientemente de la escala de fermentación empleada. Las cepas no-*Saccharomyces* estudiadas, pueden ser empleadas para la elaboración de vinos con diferentes perfiles organolépticos tanto en cultivo secuencial o mixto en función de la cepa utilizada. En general, las inoculaciones secuenciales han producido vinos diferenciados en relación a las características organolépticas aportadas por la cepa de levadura no-*Saccharomyces* respecto al control, lo que coincide con resultados similares obtenidos en otros estudios (Ciani y Ferraro, 1998; Izquierdo Cañas et al., 2011; Raynal et al., 2011; Gobbi et al., 2013; Puertas et al., 2016; Benito et al., 2016). Para asegurar la expresión de las características metabólicas de la levadura no-*Saccharomyces* en la fermentación conjunta, se deben tener en cuenta dos aspectos: i) el nivel de inoculación; ii) la duración del intervalo entre la primera y la segunda inoculación en el tipo de elaboración secuencial. Una mayor cantidad de inóculo de la levadura no-*Saccharomyces* mejora su competitividad frente a *S. cerevisiae* y otras levaduras nativas, mientras que el intervalo de tiempo que transcurre hasta la segunda inoculación con la cepa de *S. cerevisiae*, afecta a la duración de la actividad metabólica de la cepa no-*Saccharomyces* (Ciani et al., 2014).

Debido a las diferencias observadas entre los vinos obtenidos con cada una de las cepas de levadura no-*Saccharomyces*, y los dos experimentos realizados, a dos escalas diferentes con mostos estéril y no estéril, se discuten los principales resultados obtenidos para cada una de las cepas de levadura por separado.

La capacidad de la especie *T. delbrueckii* de producir vinos con baja acidez volátil ha sido observada previamente por otros autores (Ciani y Maccarelli, 1998; Bely et al., 2008; Renault et al., 2009). En nuestros trabajos, el uso de la cepa *T. delbrueckii* CLI 918 en las elaboraciones con *S. cerevisiae* CLI 889 ha mostrado resultados interesantes para la obtención de vinos con esta característica favorable. *T. delbrueckii* también ha sido descrita por su alto poder fermentativo (Castelli, 1954). Sin embargo, a pesar de los niveles de etanol producidos por esta levadura no-*Saccharomyces*, comprendidos entre el 7% y el 12% (v/v) (Cabrera et al., 1988; Ciani y Picciotti, 1995; Ciani y Maccarelli, 1998; Renault et al., 2009), se han observado paradas en la fermentación cuando se emplea en cultivo puro. En nuestro caso, el cultivo puro correspondiente a la escala de laboratorio alcanzó valores del 10,9 % de etanol (v/v), por lo que, aunque *T. delbrueckii* CLI 918 produjo la mayor cantidad de etanol del conjunto de las cepas no-*Saccharomyces* estudiadas, no llegó a consumir la totalidad de los azúcares del mosto. Este aspecto se ve mejorado cuando se adiciona en co-

cultivo con *S. cerevisiae* CLI 889, como fue anteriormente sugerido por Cordero-Bueso et al. (2013). La presencia de la cepa de *T. delbrueckii* CLI 918 durante toda la fermentación, y su mayor concentración de células a final de la fermentación secuencial a escala piloto en bodega en comparación con las otras no-*Saccharomyces* estudiadas, confirma de nuevo su alto poder fermentativo y su tolerancia al etanol acumulado en el medio (Lopes et al., 2006; Ciani et al., 2016). Además, el cultivo secuencial de *T. delbrueckii* a escala de laboratorio produce vinos con niveles de etanol más bajos; sin embargo, a escala piloto, esta disminución no ha sido tan patente, probablemente por la actividad de otras cepas minoritarias presentes en el proceso fermentativo. En contraposición con los resultados encontrados por otros autores (Bely et al., 2008; Loira et al., 2014), los vinos elaborados con *T. delbrueckii* CLI 918, tanto en cultivo puro como secuencial, han destacado por una mayor producción de glicerol respecto al control.

En cuanto a la composición aromática, estudios previos definen a la especie *T. delbrueckii* como mayor productora de  $\beta$ -feniletanol que *S. cerevisiae* (Moreno et al., 1991; Renault et al., 2009). Sin embargo, respecto a los ésteres, Viana et al. (2008) indican que en medio sintético, *T. delbrueckii* produce menos ésteres de acetato y hexanoato de etilo que *S. cerevisiae*. En condiciones similares, otros autores confirman la baja capacidad de producción de acetato de isoamilo de esta levadura, así como de butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo (Hernández-Orte et al., 2008; Plata et al., 2003; Renault et al., 2009). Sadoudi et al. (2012) mostraron que *T. delbrueckii* produce menor concentración de isoamil, hexil y  $\beta$ -feniletil acetatos que *S. cerevisiae* y mayor cantidad de 4-hidroxibutirato de etilo, 3-hexanoato de etilo y dietil succinato. Aunque es importante señalar que esta producción de compuestos aromáticos es dependiente de la cepa (Renault et al., 2009) y que los resultados son diferentes cuando *T. delbrueckii* está asociada con *S. cerevisiae* en el proceso fermentativo. En nuestro caso, la cepa *T. delbrueckii* CLI 918 en cultivo puro y sobre todo en cultivo secuencial, seleccionado como la mejor combinación en ambas escalas de fermentación, presentó mayor concentración de  $\beta$ -feniletanol y ésteres como isovalerato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y acetato de 2-feniletilo asociados al carácter frutal y floral del vino. Estos resultados coinciden con la descripción del panel de cata que lo califica como un vino con aroma frutal y floral, con mayor intensidad aromática, cuerpo y calidad global que el vino elaborado con la cepa control *S. cerevisiae* CLI 889.

Otros metabolitos cuyo contenido se ve afectado por el modo de inoculación y por las cepas empleadas en el proceso de fermentación son los polisacáridos y oligosacáridos en el vino. Se ha profundizado en el estudio de estos compuestos en los vinos elaborados a escala de laboratorio tanto en cultivo puro como en los co-cultivos entre *T. delbrueckii* CLI 918 y *S. cerevisiae* CLI 889 (subapartado 3.5. de Resultados y Discusión). Tras el análisis de la fracción de polisacáridos en los vinos Malvar, se muestra la presencia de los azúcares neutros normalmente encontrados en los polisacáridos del vino (ramnosa, arabinosa, galactosa, glucosa y manosa) (Vidal et al., 2003). La presencia de arabinosa, galactosa y manosa en los coloides totales indica que los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) y manoproteínas fueron las moléculas más abundantes en los vinos Malvar elaborados en cultivo puro, mixto y secuencial con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*.

Las levaduras no-*Saccharomyces* muestran gran capacidad para liberar polisacáridos, esencialmente manoproteínas, al vino durante la fermentación alcohólica, incluso se ha documentado que algunas cepas no-*Saccharomyces* son capaces de liberar mayor cantidad de polisacáridos que cepas de *S. cerevisiae* (Giovani et al., 2012). Esta capacidad natural de las levaduras no-*Saccharomyces* de liberar carbohidratos complejos puede ser considerada un criterio de selección para su uso en la elaboración de vinos (Ciani et al., 2010). En cuanto a los polisacáridos liberados por las levaduras durante el proceso de fermentación, se ha observado que los residuos de manosa son predominantes en las elaboraciones con la cepa *T. delbrueckii* CLI 918. Por el contrario, el cultivo puro de *S. cerevisiae* CLI 889 (control) presentó los valores más bajos de residuos de manosa. Es importante destacar la existencia de diferencias estructurales de las manoproteínas liberadas por la cepa *T. delbrueckii* CLI 918 frente a las liberadas por *S. cerevisiae*. En los cultivos puro y secuencial con *T. delbrueckii*, la mayoría de las manoproteínas están compuestas por cadenas cortas de manosa unidas en posición 2 a residuos de treonina o serina en la parte proteica formando cadenas altamente ramificadas. Esta ramificación puede ser responsable de la menor viscosidad intrínseca encontrada en los vinos obtenidos con estos cultivos tras analizar las características moleculares de la fracción de polisacáridos con la técnica SEC-MALLS; puesto que es sabido que el grado de ramificación de los polisacáridos influye en la viscosidad intrínseca (Weaver et al., 1988). Dentro de las propiedades enológicas positivas relacionadas con las manoproteínas en el vino está su capacidad de aumentar la complejidad y persistencia aromática (Chalier et al., 2007; Juega et al., 2012; Ribeiro et al., 2014) y el cuerpo del vino (Vidal et al., 2004). En

vinos sintéticos, Chalier et al. (2007) encontraron evidente la interacción entre manoproteínas secretadas por las levaduras y diferentes compuestos aromáticos, como hexanoato de etilo y  $\beta$ -ionona; además, observaron que las manoproteínas podrían ayudar a reducir la volatilidad de los compuestos aromáticos en más de un 80%. Por su parte, Juega et al. (2012) encontraron una mayor capacidad de retención de las manoproteínas en relación con determinados compuestos aromáticos (terpenos y norisoprenoides) en vinos Albariño en comparación con otros vinos estudiados. Otros autores (Comuzzo et al., 2011) concluyeron que la retención de aromas con extractos ricos en manoproteínas es un fenómeno complejo que comprende numerosas variables como pH, cepa de levadura, temperatura, interacción con componentes de la matriz, entre otros. En nuestro estudio, más ensayos deberían llevarse a cabo para relacionar el mayor contenido de manoproteínas en el cultivo secuencial de *T. delbrueckii* CLI 918 y *S. cerevisiae* CLI 889 con su complejidad aromática, aunque es evidente que este vino fue descrito por los catadores por tener mayor intensidad aromática, mayor aroma frutal y floral que el control de *S. cerevisiae* CLI 889. El análisis de los vinos de Malvar también reveló que la composición y la estructura de los oligosacáridos puede verse influenciada de manera significativa por el tipo de cultivo. Las proporciones de oligosacáridos encontradas en los vinos Malvar son similares a las encontradas en vinos blancos y tintos tranquilos (Ducasse et al., 2010; Bordiga et al., 2012; Quijada-Morín et al., 2014), así como en espumosos (Martínez-Lapiente et al., 2016). En el cultivo puro de *T. delbrueckii* CLI 918 destaca el contenido en ácido galacturónico (26,8% molar) en comparación con los demás vinos. Diferentes trabajos han encontrado con anterioridad valores similares en vino tinto. La presencia de este ácido en el vino puede estar justificada por diferencias en la composición de la pectina y de la actividad pectinasa presente en los hollejos (Ducasse et al., 2010; Apolinar-Valiente et al., 2015). En el presente estudio, este valor de ácido galacturónico puede ser en parte debido a la actividad pectinasa mostrada por la cepa de levadura *T. delbrueckii* CLI 918 (Cordero-Bueso et al., 2013).

Las levaduras del género *Schizosaccharomyces* se ha descrito que pueden degradar ácidos orgánicos como ácido málico y ácido glucónico (Gao y Fleet, 1995; Peinado et al., 2004), propiedad que ha sido utilizada a nivel práctico. La acidez presente en el vino afecta, directa o indirectamente a diferentes niveles del proceso de fermentación y determina la calidad final de éste en cuanto a composición y percepción organoléptica. Esta acidez también influye en el envejecimiento potencial o vida útil del vino así como en su estabilidad física, bioquímica y microbiológica (Volschenk et al., 2006). En cultivos mixtos

con *S. cerevisiae*, *S. pombe* ha contribuido a reducir el ácido málico y la acidez total en los mostos de uva Airén (Benito et al., 2013). Analizando los resultados obtenidos con las cepas ensayadas en este estudio, *S. pombe* CLI 1085 y CLI 1079, se observa que muestran un comportamiento similar, por lo que pueden ser empleadas en cultivo secuencial junto con *S. cerevisiae* para el consumo de ácido málico.

Pero también se ha descrito que especies de levaduras *Schizosaccharomyces*, a escala de laboratorio, se relacionan normalmente con una alta producción de ácido acético (Benito et al., 2012), lo que supone un gran inconveniente a la hora de seleccionar cepas aptas para analizar su incidencia sobre la calidad del vino. Así, varios autores proponen su uso combinado con cepas de *Saccharomyces* para obtener vinos sin defectos olfativos (Thornton y Rodríguez, 1996; Silva et al., 2003). En nuestros estudios a escala de laboratorio, la cepa *S. pombe* CLI 1085 ha mostrado niveles de acidez volátil bajos tanto en cultivo puro (0,33 g L<sup>-1</sup>) como en secuencial (0,38 g L<sup>-1</sup>), incluso inferiores a los producidos por la cepa control de *Saccharomyces* (0,50 g L<sup>-1</sup>). A escala piloto, los valores de acidez volátil en el cultivo secuencial con la cepa *S. pombe* CLI 1079 también se mantuvieron bajos (0,53 g L<sup>-1</sup>), aunque ligeramente superiores a los del control (0,40 g L<sup>-1</sup>). Por tanto, la baja producción de ácido acético por estas cepas de *S. pombe* supone un aspecto favorable aplicable a la elaboración de vinos. Al mismo tiempo, las cepas de *S. pombe* analizadas destacan por una producción de glicerol, tanto en cultivo puro como secuencial, superior a la de los cultivos control, este resultado se explica por el hecho de que la vía gliceropirúvica en *S. pombe* es más activa que en otros géneros (Suárez-Lepe y Leal, 2004).

Las cepas *S. pombe* CLI 1085 y *S. pombe* CLI 1079, empleadas en las fermentaciones a escala de laboratorio y piloto, respectivamente, no han aportado características sensoriales especiales a los vinos Malvar. En el estudio realizado por Benito et al. (2013) con mostos de uva Airén, el cultivo mixto de *S. pombe* y *S. cerevisiae* fue mejor valorado en cata que el cultivo puro de *S. cerevisiae*, sin embargo, los vinos del cultivo mixto mostraron altas concentraciones de acetaldehído, propanol y 2,3-butanodiol y ligeramente menor contenido en ésteres. La especie *S. pombe* también ha sido empleada para reducir el contenido en ácido glucónico después de la fermentación en vinos Pedro Ximénez, observándose un aumento de aromas de oxidación debidos al incremento de acetaldehído, 2,3-butanodiol y 1,1-dietoxietano, en comparación con los vinos control (Peinado et al., 2004). En nuestro caso, la cepa *S. pombe* CLI 1079 en cultivo secuencial

produjo elevada concentración de  $\beta$ -feniletanol y alta concentración de alcoholes superiores, superando los 300 mg L<sup>-1</sup> lo que puede conferir efectos negativos al aroma del vino (Rapp y Versini, 1995); también destacan concentraciones elevadas de compuestos aromáticos relacionados con aromas a queso y mantequilla, como el ácido isovaleriánico, ácido isobutírico, ácido hexanoico y ácido octanoico, en el cultivo secuencial cuando se comparan con el control.

La especie de levadura no-*Saccharomyces* que se ha descrito históricamente como productora de altas concentraciones de glicerol, del orden de 14 g L<sup>-1</sup> en vino, es la especie de levadura *C. stellata* (Ciani y Picciotti, 1995; Ciani y Maccarelli, 1998). A concentraciones en torno a 5,2 g L<sup>-1</sup> el glicerol puede producir un sabor dulce (Noble y Bursick, 1984) y de manera general aporta cuerpo y complejidad al vino (Prior et al., 2000). En nuestro caso, independientemente de la escala de fermentación ensayada, la presencia de la cepa *C. stellata* CLI 920 en las fermentaciones produjo mayor concentración de glicerol que los controles.

La especie *C. stellata* presenta un comportamiento fermentativo peculiar caracterizado por una tasa fermentativa muy baja y una alta producción de compuestos secundarios como glicerol, acetoína, acetaldehído y ácido succínico. Este comportamiento fermentativo se confirma para la cepa CLI 920 de *C. stellata*, la cual además de producir una baja cantidad de etanol en cultivo puro, está claramente dominada por *S. cerevisiae* CLI 889 tanto en cultivo mixto como secuencial. Aunque se ha comprobado que las poblaciones *C. stellata* empiezan a decrecer a partir de las 24 horas del inicio de la fermentación, se mantiene presente en el vino elaborado de manera secuencial durante todo el proceso, si bien ha sido la cepa menos competitiva de todos los cultivos secuenciales realizados. No obstante, el vino obtenido de manera secuencial entre *C. stellata* CLI 920 y *S. cerevisiae* CLI 889 ha sido bien valorado a nivel de cata y las propiedades aportadas por la cepa no-*Saccharomyces* son patentes en el vino final.

Estudios previos han atribuido a *C. stellata* la producción de aromas a albaricoque, miel, chucrut y acetato de etilo (Soden et al., 2000; Jolly et al., 2003). Estos dos últimos aromas pueden ser considerados perjudiciales para la calidad del vino ya que son aromas microbiológicos y de oxidación (Noble et al., 1987). Aunque la cepa de levadura y/o la variedad de uva afecta al perfil volátil de los vinos fermentados, el empleo de *C. stellata*, junto con *S. cerevisiae* contribuye al incremento de la complejidad aromática, así como a



una mayor percepción de determinados atributos sensoriales deseables (Ciani y Ferraro, 1996; Andorrà et al., 2010). En nuestros estudios tanto a nivel de laboratorio como de bodega, ha destacado el cultivo secuencial de *C. stellata* CLI 920 y *S. cerevisiae* CLI 889 por su alto contenido en compuestos aromáticos relacionados con aromas agradables, frutales y florales, asociados al  $\beta$ -feniletanol, al isovalerato de etilo, a los ácidos grasos de cadena media y al incremento de la concentración de los ésteres correspondientes, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Los catadores lo definen como un vino fresco y con cuerpo, con aroma floral y afrutado con recuerdos a manzana verde. A su vez, el cultivo puro de *C. stellata* a escala de laboratorio fue muy bien valorado por el panel de cata, siendo propuesta como una cepa de características adecuadas para la elaboración de vinos dulces.

Otra de las especies de levaduras no-*Saccharomyces* ampliamente estudiada en este caso en relación con la disminución de etanol en fermentaciones, es *M. pulcherrima* en cultivo secuencial con *S. cerevisiae* (Contreras et al., 2014; Varela et al., 2016). En nuestro caso, con la cepa CLI 457 de *M. pulcherrima* no se ha constatado ese efecto de reducción en el etanol, puesto que ninguna de las fermentaciones en las que esta cepa autóctona ha estado presente se ha observado una disminución del etanol producido. *M. pulcherrima* CLI 457 afecta a la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* en las combinaciones entre ambas y a diferentes escalas fermentativas ensayadas. Esto podría ser debido a la actividad killer de la especie *M. pulcherrima* descrita por Farris et al. (1991) y Lopes y Sangorrín (2010). Estudios previos (Sipiczki, 2006; Türkel y Ener, 2009) mostraron que el efecto antifúngico natural de *M. pulcherrima* está relacionado con la producción de una sal férrica del ácido pulcherrimínico (MacDonald, 1965). Además de la competencia por los nutrientes, otro mecanismo de acción descrito para especies de *Metschnikowia*, es la secreción de enzimas líticas (proteasas, glucanasas y quitinasas) que les permiten degradar otras células y utilizar sus biopolímeros como nutrientes (Türkel et al., 2014; Muccilli y Restuccia, 2015).

Esta producción de enzimas estudiada en levaduras no-*Saccharomyces* tiene su efecto positivo en relación con su capacidad de interaccionar con precursores no volátiles de las uvas e incrementar los compuestos aromáticos activos en el vino (Fernández et al., 2000; Strauss et al., 2001). La producción de enzima  $\beta$ -glucosidasa está relacionada con esta liberación de compuestos aromáticos a partir de sus precursores en la uva bajo determinadas condiciones de elaboración del vino (Rodríguez et al., 2007). Las levaduras *M. pulcherrima* CLI 457 y *L. thermotolerans* 9-6C han destacado por su gran actividad  $\beta$ -glucosidasa (Anexo II) lo que podría haber influido en la complejidad e intensidad del

aroma final de los vinos elaborados con ambas. Esta actividad enzimática ya ha sido descrita en otras cepas de las mismas especies (Parapouli et al., 2010; Sadineni et al., 2012; Domizio et al., 2016). En cuanto a los cultivos ensayados con *M. pulcherrima* CLI 457 no han destacado sensorialmente por su intensidad aromática. La combinación seleccionada como más favorable con la variedad Malvar fue en cultivo mixto con *S. cerevisiae* CLI 889 con aroma a fruta madura, plátano y dulce probablemente por la proporción de algunos ésteres como isovalerato de etilo, acetato de isoamilo y hexanoato de etilo.

Como en el caso de la mayoría de las levaduras no-*Saccharomyces*, la presencia de *M. pulcherrima* se ha relacionado generalmente con las etapas iniciales de la fermentación alcohólica (Combina et al., 2005). Para la cepa *M. pulcherrima* CLI 457 también se ha comprobado que está presente a lo largo de toda la fermentación a escala piloto, aunque su población decrece desde el inicio en la fermentación mixta, al igual que observamos en la población de *C. stellata* CLI 920 en cultivo secuencial; que como antes se ha señalado se trata de las cepas menos competitivas frente a la presencia de *S. cerevisiae* en el medio. Como ha ocurrido con otras especies de levaduras, con la cepa de *M. pulcherrima* CLI457 empleada en las elaboraciones, se observó un mayor contenido en glicerol que en los controles, tanto en cultivo puro como en co-cultivo con *S. cerevisiae*, resultados que coinciden con las observaciones de Sadineni et al. (2012) que encuentra valores de 7,6 g L<sup>-1</sup> de glicerol con *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae* en cultivo mixto.

Por su parte, la habilidad de *L. thermotolerans* de actuar como agente acidificante (productora de ácido L-láctico) tiene un interés creciente ya que el cambio climático y los cambios en las prácticas de enología, como la dilución de los mostos o la estabilización en frío, han llevado a la reducción de la acidez total de los vinos (Gobbi et al., 2013). Además, *L. thermotolerans* en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* ha mostrado resultados interesantes en vinos como reducciones de pH y de acidez volátil, además de aumentos en la acidez total, glicerol y del contenido de β-feniletanol (Cominiti et al., 2011). La capacidad de producir ácido L-láctico por la cepa a *L. thermotolerans* 9-6C puede ser de utilidad para incrementar la acidez en vinos de uvas de la variedad Malvar, caracterizada por su baja acidez. En el caso de *L. thermotolerans*, el aumento de la acidez total producida por esta especie podría también influir en el crecimiento de *S. cerevisiae* y otras especies de levaduras.

Se ha podido comprobar que el efecto de *L. thermotolerans* 9-6C sobre la acidez total y el pH final en los vinos está influido por el tipo de inoculación realizada cuando se combina con *S. cerevisiae* CLI 889. En los cultivos secuenciales, debido a la inoculación previa de *L. thermotolerans*, la acidez total es más elevada y el pH más bajo que en el cultivo mixto; *L. thermotolerans* en cultivo secuencial tiene mayor influencia en las características organolépticas del vino final, y muestra dominancia a lo largo del proceso sobre *S. cerevisiae*. Este patrón de competitividad en las diferentes estrategias de inoculación entre *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* ha sido también observado por otros autores (Gobbi et al., 2013; Benito et al., 2016). Al contrario que en estudios previos, *L. thermotolerans* 9-6C en cultivo secuencial en ambas escalas de fermentación, no disminuye la acidez volátil ni eleva el contenido de glicerol; por el contrario, en cultivo mixto sí muestra menor acidez volátil y mayor contenido de glicerol en relación a los controles, como han observado otros autores (Cominiti et al., 2011; Mostert y Divol, 2014).

En cuanto a la cepa de *L. thermotolerans* 9-6C produjo vinos de calidad e intensidad aromática tanto en cultivo mixto como secuencial con *S. cerevisiae* CLI 889; el cultivo secuencial muestra una alta concentración de alcoholes superiores destacando la concentración de  $\beta$ -feniletanol y lactato de etilo, en coincidencia con otros autores (Gobbi et al., 2013), y fue valorado por el panel de cata por su acidez, frescura en boca y aroma afrutado (fruta madura) y floral. En cultivo mixto, donde las características aportadas por la cepa no-*Saccharomyces* se ven suavizadas, se describe como un vino de sabor intenso, con una acidez equilibrada, con cuerpo y alcohólico con un toque de dulzor; con gran intensidad aromática, notas frutales a cítricos y frutos secos.

Con la realización de la presente tesis, se ha conseguido la selección de levaduras autóctonas *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* que pueden ser empleadas para la mejora de los vinos de la D.O. “Vinos de Madrid”. Se han seleccionado 12 cepas de *S. cerevisiae* procedentes de bodegas de la D.O. adaptadas a las condiciones climáticas de su área de producción y con buenas aptitudes fermentativas que ayudarán a preservar la calidad e identidad de los vinos de la región. Además, se proporcionan las bases para la implantación de nuevas estrategias biotecnológicas, como lo son las diferentes combinaciones entre *S. cerevisiae* y las cepas no-*Saccharomyces* ensayadas, para la mejora de la calidad de los vinos Malvar pudiéndose implantar dichos procesos de elaboración en bodegas comerciales.

Aunque se ha conseguido aportar nuevas características organolépticas y sensoriales con la aplicación de los co-cultivos empleando las cepas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* autóctonas de la D.O. “Vinos de Madrid”, se necesitarían más estudios que ayuden a aplicar protocolos de inoculación particulares para las cepas inoculadas para así conseguir reducir el tiempo de fermentación y prevenir el crecimiento arrollador de la cepa de *S. cerevisiae* inoculada en el ensayo. A veces, se plantea la necesidad de aplicar un protocolo de cultivo independiente según la cepa empleada para conseguir el fin deseado en el vino (Ciani et al., 2014). En el cultivo secuencial, una estrategia para conseguir estos fines podría ser la inoculación más temprana de la cepa de *S. cerevisiae*, o aumentar la cantidad de inóculo inicial de la cepa de no-*Saccharomyces* con el fin de alcanzar en un menor tiempo el 5% de etanol (v/v) e inocular la cepa de *S. cerevisiae*, o bien aumentar el número de células inoculadas de *S. cerevisiae* en segunda instancia. Se ha de tener en cuenta que un largo tiempo de retraso en la segunda inoculación es difícil de realizar en condiciones reales de bodega debido a la probable contaminación de la microbiota nativa aún más cuando la competitividad de la cepa de no-*Saccharomyces* es baja. Y, por otra parte, el uso de una subida en el nivel de inoculación supone un incremento sustancial de los costes del proceso de fermentación que deberían ser evaluados.

#### 4.1. Bibliografía

- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M. y Esteve-Zarzoso, B. (2010) ‘Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations’, *European Food Research and Technology*, 231(2), pp. 215–224.
- Antunovics, Z., Csoma, H. y Sipiczki, M. (2003) ‘Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botrytized Tokaj wines.’, *Bulletin de l’O.I.V.*, 76, pp. 380–397.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Williams, P., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M. y Doco, T. (2015) ‘Oligosaccharides of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines’, *Food Chemistry*, 179, pp. 311–317.
- Arroyo, T., Cordero, G., Serrano, A. y Valero, E. (2010) ‘ $\beta$ -Glucosidase production by non-*Saccharomyces* yeasts isolated from vineyard’, in Blank, I., Wüst, M., Yeretizian, C. (ed.) *Expression of Multidisciplinary Flavour Science*. Switzerland: Zürich University of Applied Sciences, pp. 359–362.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E. y Querol, A. (2008) ‘Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex’, *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), pp. 188–195.
- Bely, M., Rinaldi, A. y Dubourdieu, D. (2005) ‘Influence of physiological state of inoculum on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation’, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39(4), pp. 191–197.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. y Dubourdieu, D. (2008) ‘Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation’, *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), pp. 312–320.

- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F. y Benito, S. (2016) 'Quality and composition of Airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), pp. 135–144.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Palmero, D. y Suárez-Lepe, J. A. (2013) 'Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines', *European Food Research and Technology*, 236(1), pp. 29–36.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F. y Suárez-Lepe, J. a (2012) 'New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines', *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), pp. 2101–2108.
- Bisson, L. F., Waterhouse, A. L., Ebeler, S. E., Walker, M. A. y Lapsley, J. T. (2002) 'The present and future of the international wine industry', *Nature*, 418, pp. 696–699.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Meyrand, M., German, J. B., Lebrilla, C. B., Coisson, J. D., Arlorio, M. y Barile, D. (2012) 'Identification and characterization of complex bioactive oligosaccharides in white and red wine by a combination of mass spectrometry and gas chromatography', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), pp. 3700–3707.
- Branco, P., Viana, T., Albergaria, H. y Arneborg, N. (2015) 'Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells', *International Journal of Food Microbiology*, 205, pp. 112–118.
- Cabrera, M. J., Moreno, J., Ortega, J. M. y Medina, M. (1988) 'Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximénez grapes in various degrees of ripeness', *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(4), pp. 283–287.
- Castelli, T. (1954) 'Les agents de la fermentation vinaire', *Archives of Microbiology*, 20, pp. 323–342.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T. y Gunata, Z. (2007) 'Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains', *Food Chemistry*, 100(1), pp. 22–30.
- Chamberlain, G., Husnik, J. y Subden, R. E. (1997) 'Freeze-desiccation survival in wild yeasts in the bloom of icewine grapes', *Food Research International*, 30(6), pp. 435–439.
- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L. y Comitini, F. (2014) 'Sequential fermentation using non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine', *BIOWeb of Conferences*, 3(2015), pp. 1–3.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. y Domizio, P. (2010) 'Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking', *FEMS Yeast Research*, 10(2), pp. 123–133.
- Ciani, M. y Ferraro, L. (1996) 'Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells', *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), pp. 128–132.
- Ciani, M. y Ferraro, L. (1998) 'Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines', *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), pp. 247–254.
- Ciani, M. y Maccarelli, F. (1998) 'Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), pp. 199–203.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J. A., Oro, L., Rodrigues, A. J. y González, R. (2016) 'Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines', *Frontiers in Microbiology*, 7:642.
- Ciani, M. y Picciotti, G. (1995) 'The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making', *Biotechnology Letters*, 17(11), pp. 1247–1250.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A. y Martínez, C. (2005) 'Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina', *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), pp. 237–243.
- Cominiti, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2011) 'Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Microbiology*, 28(5), pp. 873–882.

- Comuzzo, P., Tat, L., Fenzi, D., Brotto, L., Battistutta, F. y Zironi, R. (2011) 'Interactions between yeast autolysates and volatile compounds in wine and model solution', *Food Chemistry*, 127(2), pp. 473–480.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C. y Varela, C. (2014) 'Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), pp. 1670–1678.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M. y Arroyo, T. (2013) 'Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.)', *European Food Research and Technology*, 236(1), pp. 193–207.
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F. y Bamforth, C. W. (2016) '*Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer', *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), pp. 599–604.
- Ducasse, M. A., Williams, P., Meudec, E., Cheynier, V. y Doco, T. (2010) 'Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS', *Carbohydrate Polymers*, 79(3), pp. 747–754.
- Farris, G. A., Mannazzu, I. y Budroni, M. (1991) 'Identification of killer factor in the yeast genus *Metschnikowia*', *Biotechnology Letters*, 13(4), pp. 297–298.
- Fernández, M., Úbeda, J. F. y Briones, A. I. (2000) 'Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making', *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), pp. 29–36.
- Gao, C. y Fleet, G. H. (1995) 'Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts', *Food Microbiology*, 12(1), pp. 65–71.
- Giovani, G., Rosi, I. y Bertuccioli, M. (2012) 'Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation', *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), pp. 113–118.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2013) '*Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine', *Food Microbiology*, 33(2), pp. 271–281.
- Goddard, M. R. (2008) 'Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation', *Ecology*, 89(8), pp. 2077–2082.
- Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E. y Ferreira, V. (2008) 'The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera', *Food Chemistry*, 107(3), pp. 1064–1077.
- Hohmann, S. (2002) 'Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeasts', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), pp. 300–372.
- Izquierdo Cañas, P. M., Palacios García, A. T. y García Romero, E. (2011) 'Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast starter', *Vitis*, 50(4), pp. 177–182.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. H. P. y Pretorius, I. S. (2003) 'The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), pp. 55–62.
- Juega, M., Nunez, Y. P., Carrascosa, A. V. y Martínez-Rodríguez, A. J. (2012) 'Influence of yeast mannoproteins in the aroma improvement of white wines', *Journal of Food Science*, 77(8), pp. M499–504.
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y. y Arneborg, N. (2015) 'Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(23), pp. 10191–10207.
- Koukkou, A. I., Tsoukatos, D. y Drainas, C. (1990) 'Effect of ethanol on the phospholipid and fatty acid content of *Schizosaccharomyces pombe* membranes', *Journal of General Microbiology*, 136, pp. 1271–1277.
- Koukkou, A. I., Tsoukatos, D. y Drainas, C. (1993) 'Effect of ethanol on the sterols of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*', *FEMS Microbiology Letters*, 111, pp. 171–176.



- Laffon-Lafourcade, S. Lucmaret, V., Joyeux, A. y Ribéreau-Gayon, P. (1981) 'Utilisation de levains mixtes dans l'élaboration des vins de pourriture noble, en vue de réduire l'acidité volatile', *Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture de France*, 67, pp. 616–622.
- Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A. y Portillo, M. C. (2016) 'Saccharomyces and non-Saccharomyces competition during microvinification under different sugar and nitrogen conditions', *Frontiers in Microbiology*, 7:1959.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I. y Suárez-Lepe, J. A. (2014) 'Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality', *LWT - Food Science and Technology*, 59, pp. 915–922.
- Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Querol, A., Bramardi, S. y Caballero, A. C. (2006) 'Relationship between molecular and enological features of Patagonian wine yeasts: Relevance in selection protocols', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(8), pp. 827–833.
- Lopes, C. A. y Sangorrín, M. P. (2010) 'Optimization of killer assays for yeast selection protocols', *Revista Argentina de Microbiología*, 42(4), pp. 298–306.
- MacDonald, J. C. (1965) 'Biosynthesis of pulcherriminic acid', *The Biochemical Journal*, 96(2), pp. 533–538.
- Martínez-Lapiente, L., Apolinar-Valiente, R., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., Williams, P. y Doco, T. (2016) 'Influence of grape maturity on complex carbohydrate composition of red sparkling wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), pp. 5020–5030.
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A. y Beltran, G. (2012) 'Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source', *FEMS Yeast Research*, 12(4), pp. 477–485.
- Moreno, J. J., Millán, C., Ortega, J. M. y Medina, M. (1991) 'Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures', *Journal of Industrial Microbiology*, 7(3), pp. 181–189.
- Mostert, T. T. y Divol, B. (2014) 'Investigating the proteins released by yeasts in synthetic wine fermentations', *International Journal of Food Microbiology*, 171, pp. 108–118.
- Muccilli, S. y Restuccia, C. (2015) 'Bioprotective role of yeasts', *Microorganisms*, 3(4), pp. 588–611.
- Nissen, P., Nielsen, D. y Arneborg, N. (2003) 'Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism', *Yeast*, 20(4), pp. 331–341.
- Noble, A. C., Arnold, R. A., Buechsenstein, J., Leach, E. J., Schmidt, J. O. y Stern, P. M. (1987) 'Modification of a standardized system of wine aroma terminology', *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(2), pp. 143–146.
- Noble, A. C. y Bursick, G. F. (1984) 'The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine.', *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), pp. 110–112.
- Parapouli, M., Hatziloukas, E., Drinas, C. y Perisynakis, A. (2010) 'The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavour', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(1), pp. 85–93.
- Peinado, R. A., Moreno, J. J., Maestre, O., Ortega, J. M., Medina, M. y Mauricio, J. C. (2004) 'Gluconic acid consumption in wines by *Schizosaccharomyces pombe* and its effect on the concentrations of major volatile compounds and polyols', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), pp. 493–497.
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T. y Girio, F. (2006) 'Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*', *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), pp. 336–345.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C. y Ortega, J. M. (2003) 'Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts', *Food Microbiology*, 20(2), pp. 217–224.
- Pretorius, I. S. y Høj, P. B. (2005) 'Grape and wine biotechnology: challenges, opportunities and potential benefits', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), pp. 83–108.



- Prior, B. A., Toh, T. H., Jolly, N., Baccari, C. y Mortimmer, R. K. (2000) 'Impact of yeast breeding for elevated glycerol production on fermentative activity and metabolite formation in Chardonnay wine.', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(2), p. 92–99.
- Puertas, B., Jiménez, M. J., Cantos-Villar, E., Cantoral, J. M. y Rodríguez, M. E. (2016) 'Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates', *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), pp. 733–746.
- Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T. y Escribano-Bailón, M. T. (2014) 'Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency', *Food Chemistry*, 154, pp. 44–51.
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñero, A. y Ribas, J. C. (2015) 'A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus', *Frontiers in Microbiology*, 6:983.
- Ranganathan, B. y Bhat, J. V (1958) 'Ethanol tolerance of some yeasts', *Journal of the Indian Institutes of Science*, pp. 105–110.
- Rankine, B. C. (1967) 'Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(12), pp. 583–589.
- Rapp, A. y Versini, G. (1995) 'Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines', *Developments in Food Science*, 37, pp. 1659–1694.
- Raynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Languet, P., Dumont, A. y Ortiz-Julien, A. (2011) 'An innovative tool for winemakers: Sequential inoculation with a non-*Saccharomyces* yeast and a *Saccharomyces cerevisiae* yeast', *Wine and Viticulture Journal*, 26(1), pp. 22–32.
- Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L. y Dequin, S. (2003) 'Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to GpdIp and is only partially controlled by the HOG pathway', *Yeast*, 20(15), pp. 1243–1253.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A. y Bely, M. (2009) 'Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry', *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), pp. 201–210.
- Ribeiro, T., Fernandes, C., Nunes, F. M., Filipe-Ribeiro, L. y Cosme, F. (2014) 'Influence of the structural features of commercial mannoproteins in white wine protein stabilization and chemical and sensory properties', *Food Chemistry*, 159, pp. 47–54.
- Rodríguez, M. E., Lopes, C., Valles, S., Giraudo, M. R. y Caballero, A. (2007) 'Selection and preliminary characterization of  $\beta$ -glycosidases producer Patagonian wild yeasts', *Enzyme and Microbial Technology*, 41, pp. 812–820.
- Rousseau, S. y Donèche, B. (2001) 'Effects of water activity (aw) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry', *Vitis*, 40(2), pp. 75–78.
- Sadineni, V., Kondapalli, N. y Obulam, V. S. R. (2012) 'Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine', *Annals of Microbiology*, 62(4), pp. 1353–1360.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J. y Alexandre, H. (2012) 'Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts', *Food Microbiology*, 32(2), pp. 243–253.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A. y Guillamón, J. M. (2011) 'Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Microbiology*, 28(6), pp. 1155–1161.
- Serra, A., Strehaiano, P. y Taillandier, P. (2005) 'Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters', *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), pp. 257–265.

- Silva, S., Ramon-Portugal, F., Andrade, P., Texera, M. y Strehaino, P. (2003) 'Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*', *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(1), pp. 50–55.
- Sipiczki, M. (2006) '*Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), pp. 6716–6724.
- Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H. y Henschke, P. a (2000) 'Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), pp. 21–30.
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G. y van Rensburg, P. (2001) 'Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts', *Journal of Applied Microbiology*, 91, pp. 182–190.
- Suárez-Lepe, J. A. y Leal, I. (2004) *Microbiología enológica: Fundamentos de vinificación*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. p. 716
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A. y Brandam, C. (2014) 'Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), pp. 1959–1967.
- Taillandier, P., Portugal, F. R., Fuster, A. y Strehaino, P. (2007) 'Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content', *Food Microbiology*, 24(1), pp. 95–100.
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. (2012) 'Genetic diversity in commercial wineries: Effects of the farming system and vinification management on wine yeasts.', *Journal of applied microbiology*, 112(2), pp. 302–315.
- Thornton, R. J. y Rodríguez, S. B. (1996) 'Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevorans* under commercial winemaking conditions', *Food Microbiology*, 13(6), pp. 475–482.
- Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G. E., Torriani, S., Paparella, A. y Suzzi, G. (2009) 'Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must', *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), pp. 179–187.
- Türkel, S. y Ener, B. (2009) 'Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64(5–6), pp. 405–410.
- Türkel, S., Korukluoğlu, M. y Yavuz, M. (2014) 'Biocontrol activity of the local strain of *Metschnikowia pulcherrima* on different postharvest pathogens.', *Biotechnology Research International*, 2014:397167.
- Varela, C., Dry, P. R., Kutyna, D. R., Francis, I. L., Henschke, P. A., Curtin, C. D. y Chambers, P. J. (2015) 'Strategies for reducing alcohol concentration in wine', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, pp. 670–679.
- Varela, C., Sengler, F., Solomon, M. y Curtin, C. (2016) 'Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*', *Food Chemistry*, 209, pp. 57–64.
- Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S. y Manzanares, P. (2008) 'Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits', *Food Microbiology*, 25(6), pp. 778–785.
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V. y Waters, E. (2004) 'The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium', *Food Chemistry*, 85(4), pp. 519–525.
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M. y Pellerin, P. (2003) 'The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization', *Carbohydrate Polymers*, 54(4), pp. 439–447.

Volschenk, H., Van Vuuren, H. J. J. y Viljoen-Bloom, M. (2006) 'Malic acid in wine: Origin, function and metabolism during vinification', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(2), pp. 123–136.

Wang, C., Mas, A. y Esteve-Zarzoso, B. (2016) 'The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific', *Frontiers in Microbiology*, 7:502.

Weaver, L., Yu, L. P. y Rollings, J. E. (1988) 'Weighted intrinsic viscosity relationships for polysaccharide mixtures in dilute aqueous solutions', *Journal of Applied Polymer Science*, 35, pp. 1631–1637.

## **5. CONCLUSIONES GENERALES**

### **GENERAL CONCLUSIONES**





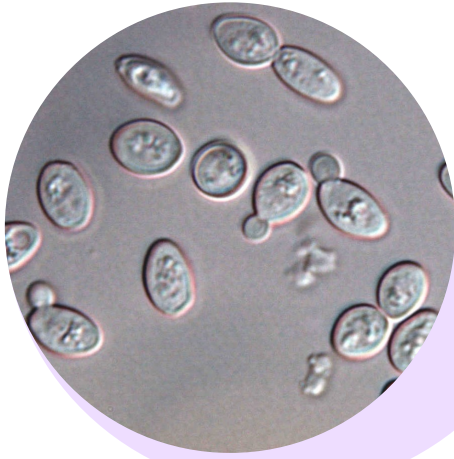
1. De las 94 cepas de *S. cerevisiae* analizadas, se han preseleccionado 12 cepas autóctonas como resistentes a las condiciones de estrés en función de su respuesta fermentativa, considerando los parámetros: cinética fermentativa, grado alcohólico alcanzado y producción de acidez volátil.
2. En fermentaciones con mosto de la variedad Malvar, y comparando con la cepa autóctona control CLI 889, de las 12 cepas preseleccionadas destacaron las cepas G491 y G144 por los niveles de  $\beta$ -feniletanol (aroma floral) obtenidos, y las cepas G144, G464, G491, G520 destacaron por la elevada concentración de ésteres producidos.
3. Tras el análisis sensorial de los vinos elaborados con las cepas preseleccionadas, no se detectaron aromas desagradables o notas de oxidación en los vinos. Las cepas de *S. cerevisiae* G464, G1 y G491 produjeron los vinos mejor valorados por los catadores por su aroma floral y frutal y su calidad global.
4. De entre las cepas no-*Saccharomyces* estudiadas, las más resistentes a estrés osmótico fueron las pertenecientes a los géneros *Lachancea* (*Kluyveromyces*), *Torulaspora* y *Metschnikowia*; mientras que *S. pombe* se mostró como la especie más resistente a etanol.
5. A escala de laboratorio las inoculaciones mixtas, en general, muestran una cinética fermentativa similar al cultivo puro de *S. cerevisiae* CLI 889 (control). Se evidencia la presencia de la cepa no-*Saccharomyces* en este tipo de fermentación, tanto en el análisis químico como en el sensorial de los vinos finales obtenidos.
6. En la cinética fermentativa a escala de laboratorio de las inoculaciones secuenciales de *T. delbrueckii* CLI 918, *C. stellata* CLI 920 y *M. pulcherrima* CLI 457, se observa un incremento en la liberación de CO<sub>2</sub> tras la inoculación de *S. cerevisiae* CLI 889. Este aumento no se detecta para las cepas *S. pombe* CLI 1085 y *L. thermotolerans* 9-6C. Este efecto podría ser debido a la mayor captación de nutrientes por parte de estas levaduras no-*Saccharomyces*, quedando menos nutrientes disponibles en el medio cuando se inocula la cepa de *S. cerevisiae*. Los vinos obtenidos tras las inoculaciones secuenciales muestran mayor complejidad aromática, presentando propiedades organolépticas más próximas a las de los cultivos puros de la cepa no-*Saccharomyces* que a la fermentación control.

7. En función de las propiedades organolépticas, las mejores estrategias de inoculación a escala de laboratorio para la elaboración de vinos Malvar en la D.O. “Vinos de Madrid”, varía dependiendo de la cepa de no-*Saccharomyces* utilizada.
8. El sistema de qPCR junto con el diseño de cebadores específicos ha permitido estudiar la evolución de las diferentes poblaciones levaduriformes inoculadas. Se ha confirmado que las especies de levaduras no-*Saccharomyces* utilizadas en los cultivos mixtos y secuenciales están presentes a lo largo de todo el proceso de fermentación.
9. Las estrategias de inoculación seleccionadas a escala de laboratorio se han confirmado a escala piloto. Se ha detectado una notable mejora en la calidad de los vinos obtenidos con la variedad autóctona Malvar a escala piloto.
10. Los catadores han sido capaces de distinguir las diferentes estrategias de inoculación respecto al vino control, siendo estos vinos mejor valorados.
11. A mayor escala, el cultivo secuencial se confirma como el tipo de inoculación que produce vinos más diferentes cuando se comparan con los vinos elaborados con la cepa control *S. cerevisiae* CLI 889 en cultivo puro. Estos resultados sientan las bases para el empleo de nuevas estrategias biotecnológicas para mejorar la calidad de los vinos Malvar, pudiendo ser transferibles a bodegas comerciales.
12. La cepa de levadura inoculada tiene un impacto significativo en la composición y estructura de los carbohidratos analizados en el vino.
13. Se han encontrado diferencias estructurales en las manoproteínas liberadas por las cepas *T. delbrueckii* CLI 918 y *S. cerevisiae* CLI 889.
14. La inoculación secuencial con las cepas *T. delbrueckii* CLI 918 y *S. cerevisiae* CLI 889 mostró mayor cantidad de manoproteínas que la fermentación control con *S. cerevisiae* CLI 889. Este hecho se puede relacionar con la mayor complejidad y calidad de los vinos Malvar de la D.O. “Vinos de Madrid”, elaborados con esta estrategia de inoculación.



1. Of the 94 *S. cerevisiae* strains analyzed, 12 native strains have been preselected as resistant strains to stress conditions with regard to their fermentative response, considering the following parameters: fermentative kinetic, alcohol degree and volatile acidity production.
2. In fermentations with grape variety Malvar must, the strains G491 y G144 stood out for their  $\beta$ -phenylethyl alcohol levels (flowery aroma), and the strains G144, G464, G491 y G520 presented the highest concentration of esters, compared with CLI 889 native control strain.
3. After sensory analysis of wines elaborated with the preselected strains, unpleasant smells or oxidative notes were not detected in the wines. The wines obtained by fermentation with G464, G1 and G491 had the highest scores regarding the fruity and floral odour and the overall quality.
4. Among non-*Saccharomyces* strains studied, the most resistant to osmotic stress were those belonging to *Lachancea* (*Kluyveromyces*), *Torulaspora* and *Metschnikowia*; while *S. pombe* was shown as the most ethanol tolerant strain.
5. Mixed inoculations at laboratory scale, in general, showed a fermentative kinetic similar to pure culture of *S. cerevisiae* CLI 889 (control). The presence of non-*Saccharomyces* strain in this type of inoculation is clear, both chemical and sensory analyses in the final wines.
6. An increase in the CO<sub>2</sub> release, after *S. cerevisiae* inoculation, is observed in the kinetic fermentation of sequential cultures with *T. delbrueckii* CLI 918, *C. stellata* CLI 920 y *M. pulcherrima* CLI 457 at laboratory scale. This increase was not detected with *S. pombe* CLI 1085 and *L. thermotolerans* 9-6C strains. This effect could be due to the higher nutritional requirements by these non-*Saccharomyces* strains that produces a decrease in the nutrient availability into the medium when *S. cerevisiae* is inoculated. The wines elaborated in sequential cultures showed a higher aroma complexity and presented organoleptic properties closer to pure cultures of non-*Saccharomyces* tested than the control.
7. According to the organoleptic properties, the best inoculation strategies at laboratory scale for Malvar wines elaboration from D.O. “Vinos de Madrid” varies depending on the non-*Saccharomyces* strain used.

8. The qPCR system combined with the design of specific primers has allowed to study the dynamics of different yeast populations inoculated. It has been confirmed that the non-*Saccharomyces* species used in mixed and sequential cultures were presented throughout fermentation process.
9. The selected inoculation strategies at laboratory scale has also been confirmed at pilot scale. A notable improvement in the quality of wines obtained with native grape variety Malvar has been detected at pilot scale.
10. Tasters were able to distinguish the different inoculation strategies from the control, being these wines the most highly valued.
11. At pilot scale, the sequential culture is confirmed as the type of inoculation that produced the more different wines than the pure culture of *S. cerevisiae* CLI 889. These results provide the basis for the use of new biotechnological strategies in order to improve the quality of Malvar wines, being able to be transferable to commercial wineries.
12. Yeast species and type of inoculation have a significant impact in wine carbohydrate composition and structure.
13. Structural differences have been found between mannoproteins released by *T. delbrueckii* CLI 918 y *S. cerevisiae* CLI 889.
14. Sequential cultures with *T. delbrueckii* CLI 918 and *S. cerevisiae* CLI 889 showed larger amount of mannoproteins than control fermentation with *S. cerevisiae* CLI 889. This fact can be associated with higher complexity and quality of Malvar wines from D.O. “Vinos de Madrid” found in this inoculation strategy.



# **ANEXO I**

ABREVIATURAS



%	porcentaje
°B	grado Brix
°C	grado centígrado
a. C.	antes de Cristo
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribosomal
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AG	arabinogalactano
AGP	arabinogalactano proteínas
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
Cl	cloro
CLI	Colección de Levaduras del IMIDRA
CMC	carboximetilcelulosa
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
C <sub>T</sub>	threshold cycle
D.O.	Denominación de Origen
DCM	diclorometano
DFA	Discriminant Function Analysis
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO	dimetilsulfóxido
dn/dc	refractive index increment value
dNTPs	2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates
E	eficiencia

EMA-PCR	Ethidium Bromide Monoazide-PCR
EN	European Norm
ESI	Electrospray Ionization
eV	electronvoltio
FID	Flame Ionization Detector
FISH	Fluorescence in Situ Hybridization
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
g	gramo
GAP	Grado Alcohólico Probable
GC	Gas Chromatography
GJIA	solid grape juice indicator agar
GL	glucano
h	hora
H <sub>2</sub> S	sulfuro de hidrógeno
ha	hectárea
HG	homogalacturonano
hl	hectolitro
HRSEC	High-Resolution Size-Exclusion Chromatography
i.d.	inner diameter
IEC	International Electrotechnical Commission
ISO	International Standardization Organization
ITS	Internal Transcribed Spacers
KDa	kilodalton
L	litro

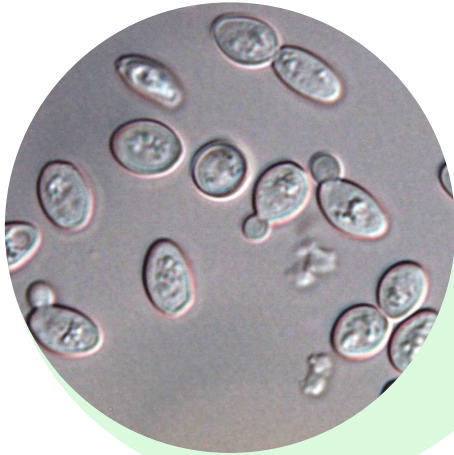
m	metro
M	molar
m/z	mass-to-charge ratio
MALLS	Multiangle Laser-Light Scattering
Mg	magnesio
mg	milígramo
mm	milímetro
mM	milimolar
M <sub>n</sub>	number-average mass
MP	manoproteína
MS	Mass Spectrometry
M <sub>w</sub>	molecular weight
N	nitrógeno
N	norte
N°	número
Na	sodio
NAD <sup>+</sup>	dinucleótido de dicotinamida y adenina
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NFA	Nitrógeno Fácilmente Asimilable
ng	nanogramo
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	nanómetro
O	oxígeno
OAV	Odour Activity Value



ODE	Odour Description
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
OTV	Odour Threshold Value
p/v	peso/volumen
pb	pares de bases
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PM	Phenotypic Microarray technology
PRAG	polisacárido rico en arabinosa y galactosa
R <sup>2</sup>	coeficiente de correlación
RAPD	Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic
RFU	Relative Fluorescence Units
RG	ramnogalacturonano
RI	Refractive Index
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR (qPCR)	Real-Time PCR (quantitative PCR)
S	azufre
SEC	Size Exclusion Chromatography
SO <sub>2</sub>	dióxido de azufre
SSR	Simple Sequence Repeats
TBE	Tris-Borate-EDTA
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis

UFC	Unidad Formadora de Colonias
UNE	Norma Española
v/v	volumen/volumen
W	west
w/v	weight/volume
YAN	Yeast Assimilable Nitrogen
YPD	yeast peptone dextrose medium
YPGE	non-fermentable carbon source glycerol/ethanol
$\eta$	viscosidad intrínseca
$\mu\text{A}$	microamperio
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrómetro
$\mu\text{M}$	micromolar





# **ANEXO II**

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Características principales de las cepas de levaduras seleccionadas.....	260
II.2. Medios de cultivo .....	264
<i>Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (YPD)</i> .....	264
<i>Agar lisina</i> .....	264
<i>Mosto de uva de la variedad Malvar</i> .....	265
II.3. Análisis químico de mostos y vinos .....	265
<i>Grado Brix (°Brix) y Grado alcohólico probable (GAP)</i> .....	265
<i>Acidez total titulable y pH</i> .....	266
<i>Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)</i> .....	266
<i>SO<sub>2</sub> libre y SO<sub>2</sub> total</i> .....	266
II.4. Monitorización y control de la fermentación .....	267
<i>Análisis de densidad del mosto-vino</i> .....	267
<i>Control de pérdida de peso del mosto-vino</i> .....	267
II.5. Recuento de poblaciones de levaduras mediante diluciones sucesivas y siembra en placa .....	268
II.6. Extracción de ADN de las levaduras.....	271
<i>DNeasy minikit Plant de extracción de ADN (Qiagen, EE.UU.)</i> .....	271
<i>ArchivePure DNA Purification kit de extracción de ADN (5PRIME, Germany)</i> .....	272
II.7. Identificación y cuantificación de levaduras .....	274
<i>PCR-RFLP de las regiones ITS del ADNr 5.8S</i> .....	274
<i>Secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S del ADNr</i> .....	275
<i>Diseño de cebadores</i> .....	276
<i>PCR cuantitativa (qPCR)</i> .....	279

II.8. Técnicas de caracterización de levaduras.....	280
<i>Tecnología de fenotipo microarrays (PM)</i> .....	280
<i>PCR-SSR (secuencias simples repetidas) o de microsatélites</i> .....	282
II.9. Análisis del contenido y estructura de polisacáridos y oligosacáridos en vino .....	283
<i>Decoloración de las muestras</i> .....	283
<i>Separación de las fracciones de polisacáridos y oligosacáridos en el vino</i> .....	284
<i>Análisis de la estructura y composición de los polisacáridos del vino</i> .....	286
<i>Estudio de características moleculares de los polisacáridos del vino</i> .....	286
<i>Análisis de los oligosacáridos del vino</i> .....	287
II.10. Análisis de compuestos aromáticos por cromatografía de gases (GC) .....	288
<i>Extracción de los compuestos volátiles mayoritarios</i> .....	288
<i>Identificación de los compuestos volátiles por GC-FID</i> .....	289
II.11. Análisis sensorial de vinos .....	291
<i>Sala de cata</i> .....	291
<i>Panel de cata</i> .....	292
<i>Pruebas triangulares</i> .....	292
<i>Pruebas descriptivas</i> .....	293
<i>Fichas de cata</i> .....	294
<i>Tablas de significación</i> .....	296
II.12. Bibliografía.....	297

### II.1. Características principales de las cepas de levaduras seleccionadas

Las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo de tesis doctoral fueron aisladas e identificadas en estudios previos en el IMIDRA y están incluidas en la colección de levaduras del IMIDRA (CLI). Actualmente la colección está integrada por unas 1.200 aislados de *S. cerevisiae* agrupadas en 400 genotipos diferentes. Dentro de la colección existen cepas procedentes de diferentes regiones españolas (50 cepas) y cepas de *S. cerevisiae* (100) correspondientes al grupo de levaduras de velo, aisladas en zonas de elaboración de vinos generosos. A su vez, la colección cuenta con 22 cepas comerciales, mientras que el resto de las cepas que la integran fueron aisladas en viñedos y bodegas convencionales y ecológicas de la Denominación de Origen "Vinos de Madrid". Además, en la colección se recogen unos 2.000 aislados de levaduras no-*Saccharomyces* identificados a nivel de género y especie, y repartidos entre 12 especies diferentes. Todas las cepas se han identificado mediante técnicas moleculares y se conservan en glicerol al 20% a -80°C y liofilizadas en leche descremada a temperatura ambiente y a 4°C.

Parte de las cepas empleadas en este trabajo cuentan con información complementaria relativa a sus aptitudes fermentativas y enológicas. En el caso de las cepas de no-*Saccharomyces*, se disponía de información relativa a sus propiedades biotecnológicas relacionadas con la producción de enzimas. Estos resultados han sido divulgados por diferentes autores en diferentes medios (Arroyo, 2000; Arroyo et al., 2010; Tello et al., 2012; Balboa-Lagunero, 2012; Cordero-Bueso et al., 2013; Cordero-Bueso et al., 2016).

Las principales características enológicas de los genotipos de las cepas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* usadas en las fermentaciones de esta tesis se muestran a continuación:



**Genotipos de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de viñedos y bodegas de la D.O.  
“Vinos de Madrid”**

G	B	FF	DF	GA	AV	K	G	B	FF	DF	GA	AV	K
1	A	IV	16	11.7	0.50	N	469	E	IV	18	11.3	0.35	N
2	A	IV	16	12.5	0.77	N	470	E	IV	17	11.8	0.49	N
3	A	IV	18	12.0	0.57	N	471	E	I	16	10.6	0.26	N
4	A	IV	17	13.2	0.53	K+	472	E	IV	18	11.6	0.22	N
6	A	IV	16	12.9	0.50	N	473	E	IV	18	11.2	0.15	K+
7	A	IV	14	8.9	0.31	K+	474	E	IV	17	11.7	0.26	N
8	A	IV	17	12.6	0.43	N	475	E	IV	14	11.4	0.18	N
9	A	I	16	11.9	0.89	N	476	E	IV	16	11.0	0.24	N
10	D	IV	14	13.2	0.49	N	488	E	I	16	11.9	0.53	N
11	D	IV	15	9.3	0.40	N	489	E	I	17	11.6	0.34	N
12	A	IV	16	12.2	0.49	N	490	E	III	18	12.0	0.16	N
13	A	IV	16	11.9	0.51	N	491	E	III	17	11.5	0.47	K+
14	F	IV	14	11.1	0.50	N	492	E	III	16	11.4	0.43	K+
15	A	IV	15	11.3	0.35	N	493	E	III	18	11.1	0.56	N
16	A	IV	15	13.2	0.60	N	494	E	III	16	10.9	0.92	N
17	A	IV	17	11.7	0.20	N	495	E	III	16	9.7	0.25	N
18	A	IV	15	11.2	0.91	N	496	E	III	16	13.4	0.39	N
19	A	IV	16	11.9	0.55	N	497	E	III	18	11.6	0.45	N
20	A	IV	17	11.0	0.54	N	499	E	III	17	10.6	0.31	N
22	A	IV	18	11.9	0.43	N	501	E	III	17	12.6	0.52	K+
113	B	IV	17	9.2	0.25	N	502	E	III	17	11.4	1.21	N
114	C	IV	18	11.9	0.22	N	503	F	IV	18	13.4	0.47	N
144	A	IV	15	11.0	0.41	N	504	F	III	18	10.9	0.43	K+
147	E	IV	17	10.5	0.39	N	505	F	II	17	11.6	0.43	N
198	E	IV	17	10.7	0.64	N	506	F	I	17	13.7	0.23	N
227	E	IV	18	11.0	0.62	N	507	F	II	22	11.8	0.23	K+
354	E	IV	15	11.1	0.43	N	508	F	II	22	12.2	0.41	N
361	E	IV	18	11.8	0.47	N	509	F	III	18	11.9	0.25	N
379	D	IV	16	9.7	0.37	N	510	F	III	18	11.9	0.48	N
393	E	IV	13	11.3	0.52	K+	511	F	III	18	11.9	0.59	N
406	D	IV	17	12.3	0.60	N	512	F	III	17	11.4	0.40	N
448	D	IV	17	11.7	0.34	N	513	F	III	21	11.0	0.52	N
449	E	IV	17	11.6	0.57	N	514	F	IV	18	12.0	1.30	N
450	E	IV	13	11.2	0.32	N	515	F	IV	20	12.0	0.72	N
451	E	IV	16	11.2	0.40	N	516	F	II	15	12.7	0.33	N
452	E	IV	17	11.7	0.42	N	517	F	IV	17	10.6	0.54	N
454	E	IV	20	11.9	0.58	N	518	F	III	16	11.9	0.37	N
456	E	IV	16	11.2	0.87	N	519	F	IV	17	12.2	0.23	N
457	E	IV	16	11.5	0.60	N	520	F	IV	15	12.1	0.62	N
458	E	IV	15	11.8	0.43	N	521	F	IV	18	11.8	0.39	N
460	E	IV	16	11.3	0.64	K+	522	F	IV	17	11.2	0.54	N
461	E	IV	16	12.1	0.59	N	523	F	I	20	12.4	0.63	N
462	E	IV	16	12.1	0.51	N	524	F	II	17	11.9	0.59	N
463	E	IV	16	11.6	0.29	N	528	F	III	19	9.9	0.65	N
464	E	IV	18	11.8	0.44	N	529	F	III	18	12.1	0.46	N
465	E	IV	15	12.0	0.46	N	531	F	I	16	11.2	0.35	N
468	E	IV	18	12.0	0.50	N							

G, genotipo; B, bodega (A: ecológica, subzona San Martín; B: convencional, subzona Navalcarnero; C: convencional, subzona Arganda; D: ecológica, subzona Arganda; E: ecológica, subzona San Martín; F: ecológica, subzona Arganda); FF, fase fermentativa (I: microfermentación en laboratorio, II: fase inicial en bodega, III: fase media en bodega, IV: fase final en bodega); DF, días de fermentación; GA, grado alcohólico; AV, acidez volátil; K, fenotipo killer (K+, killer positivo; N, neutro). El coeficiente de varianza de las medias en todos los casos no excede el 8%.

*Cepa S. cerevisiae CLI 889 empleada como cepa control*

Característica	CLI 889	Ésteres de acetato de alcoholes superiores (mg L <sup>-1</sup> )	
Fenotipo killer	Neutro	Acetato de etilo	39,50 ± 1,80
D.O. (aislamiento)	“Vinos de Madrid”	Acetato de isobutilo	0,02 ± 0,00
Variedad (aislamiento)	Airén	Acetato de isoamilo	3,01 ± 0,28
Fase fermentativa	Mosto-vino	Acetato de hexilo	0,26 ± 0,03
Capacidad fermentativa (%)	12,6 ± 0,1	Acetato de feniletilo	0,96 ± 0,11
Acidez volátil (g L <sup>-1</sup> de ác. acético)	0,4 ± 0,0	Ésteres de ácidos grasos (mg L <sup>-1</sup> )	
Acidez titulable (g L <sup>-1</sup> de ác. tartárico)	2,4 ± 0,1	Butirato de etilo	0,41 ± 0,04
Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	7,1 ± 1,6	Hexanoato de etilo	0,84 ± 0,10
2,3-butanodiol (mg L <sup>-1</sup> )	375,3 ± 67,5	Octanoato de etilo	0,88 ± 0,15
Ácidos orgánicos (g L <sup>-1</sup> )		Decanoato de etilo	0,28 ± 0,06
Ácido cítrico	0,23 ± 0,01	Lactato de etilo	0,09 ± 0,02
Ácido málico	1,05 ± 0,04	Succinato de dietilo	0,06 ± 0,01
Ácido láctico	0,37 ± 0,02	Ácidos grasos de cadena corta (mg L <sup>-1</sup> )	
Ácido acético	0,43 ± 0,02	Ácido isobutírico	0,44 ± 0,05
Ácido succínico	0,42 ± 0,03	Ácido butírico	0,76 ± 0,03
Aldehídos / Cetonas (mg L <sup>-1</sup> )		Ácido isovaleriánico	0,37 ± 0,10
Acetaldehído (mg L <sup>-1</sup> )	nd	Ácidos grasos de cadena media (mg L <sup>-1</sup> )	
Acetoína (mg L <sup>-1</sup> )	6,31 ± 2,12	Ácido hexanoico	2,86 ± 0,14
Alcoholes superiores (mg L <sup>-1</sup> )		Ácido octanoico	10,14 ± 0,20
1-Propanol	38,30 ± 1,52	Ácido decanoico	4,14 ± 0,77
Isobutanol	87,90 ± 2,28		
Alcohol isoamílico	194,10 ± 6,04		
1-Hexanol	1,20 ± 0,01		
2-Feniletanol	11,92 ± 0,29		

Los valores son la media ± desviación estándar de fermentaciones realizadas por triplicado

Los parámetros generales del mosto Airén de partida empleado en la fermentación con la levadura *S. cerevisiae* CLI 889, fueron: 1.088 g L<sup>-1</sup> de densidad; pH 3,48; y acidez total 5,11 (expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico).

*Cepas no-Saccharomyces empleadas en los cocultivos*

	<i>T. delbrueckii</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. stellata</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>L. thermotolerans</i>
	CLI 918	CLI 1085	CLI 1079	CLI 920	CLI 457	9-6C
D.O. (aislamiento)	“Vinos de Madrid”					
Variedad (aislamiento)	Malvar					
Año (aislamiento)	2006	2006	2006	2006	1995	2006
Capacidad fermentativa (%)	12,6 ± 2,2	12,4 ± 0,7	12,7 ± 0,6	3,7 ± 1,2	4,1 ± 0,71	3,7 ± 0,8
Acidez volátil (g L <sup>-1</sup> de ác. acético)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,02	0,1 ± 0,0
Acidez titulable (g L <sup>-1</sup> ác. tartárico)	3,9 ± 1,0	3,9 ± 0,3	3,7 ± 0,2	3,8 ± 1,1	3,6 ± 0,2	4,0 ± 0,9
Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	4,3 ± 0,1	4,9 ± 1,1	4,4 ± 0,8	3,6 ± 1,3	4,1 ± 0,8	3,9 ± 0,6
2,3-butanodiol (mg L <sup>-1</sup> )	446,0 ± 81,2	196,0 ± 88,8	183,9 ± 71,2	189,7 ± 33,2	198,4 ± 47,2	195,0 ± 11,2
<b>Aldehídos / Cetonas (mg L<sup>-1</sup>)</b>						
Acetaldehído (mg L <sup>-1</sup> )	136,62 ± 0,41	39,94 ± 0,12	25,45 ± 0,40	18,72 ± 1,12	19,84 ± 1,81	16,43 ± 0,11
Acetoína (mg L <sup>-1</sup> )	11,72 ± 2,23	31,83 ± 12,90	49,36 ± 2,82	7,48 ± 2,10	5,55 ± 0,43	9,80 ± 2,66
<b>Alcoholes superiores (mg L<sup>-1</sup>)</b>						
1-Propanol	31,61 ± 0,00	18,40 ± 0,01	15,72 ± 0,60	37,84 ± 2,21	10,52 ± 0,09	25,11 ± 0,20
Isobutanol	63,50 ± 0,41	17,82 ± 0,22	33,44 ± 0,79	30,11 ± 0,20	43,33 ± 1,12	25,84 ± 0,12
Alcohol isoamílico	146,15 ± 0,32	47,41 ± 6,21	69,03 ± 6,04	17,45 ± 0,01	27,26 ± 0,87	19,71 ± 0,01
1-Hexanol	0,90 ± 0,01	11,72 ± 0,90	6,42 ± 0,06	0,22 ± 0,00	0,15 ± 0,01	1,10 ± 0,00
2-Feniletanol	12,02 ± 0,63	45,33 ± 0,3	16,60 ± 1,83	2,52 ± 0,35	10,50 ± 0,19	7,01 ± 0,02
<b>Ésteres de acetato de alcoholes superiores (mg L<sup>-1</sup>)</b>						
Acetato de etilo	22,33 ± 0,12	10,75 ± 0,12	13,21 ± 0,15	53,94 ± 0,12	15,72 ± 0,15	25,32 ± 0,01
Acetato de isobutilo	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,03
Acetato de isoamilo	1,37 ± 0,11	0,02 ± 0,00	0,25 ± 0,06	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,03 ± 0,02
Acetato de hexilo	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00	nd
Acetato de feniletilo	0,53 ± 0,13	0,21 ± 0,09	0,71 ± 0,20	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,07 ± 0,01
<b>Ésteres de ácidos grasos (mg L<sup>-1</sup>)</b>						
Butirato de etilo	0,17 ± 0,10	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,02
Hexanoato de etilo	0,83 ± 0,23	0,10 ± 0,00	0,21 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01
Octanoato de etilo	0,11 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,25 ± 0,05	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03
Decanoato de etilo	0,19 ± 0,08	0,16 ± 0,09	0,12 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01
Lactato de etilo	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	1,29 ± 0,09	0,01 ± 0,00	1,01 ± 0,25	nd
Succinato de dietilo	0,08 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,08 ± 0,02
<b>Ácidos grasos de cadena corta (mg L<sup>-1</sup>)</b>						
Ácido isobutírico	0,23 ± 0,01	2,37 ± 0,20	3,52 ± 0,85	0,22 ± 0,06	1,95 ± 0,16	4,21 ± 0,45
Ácido butírico	0,54 ± 0,21	0,51 ± 0,22	0,60 ± 0,10	0,49 ± 0,20	0,28 ± 0,08	0,81 ± 0,32
Ácido isovaleriánico	0,22 ± 0,10	0,19 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,31 ± 0,10	0,07 ± 0,02	0,59 ± 0,12
<b>Ácidos grasos de cadena media (mg L<sup>-1</sup>)</b>						
Ácido hexanoico	2,31 ± 0,10	1,99 ± 0,07	2,87 ± 0,46	0,34 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,21 ± 0,06
Ácido octanoico	9,88 ± 5,43	0,80 ± 0,02	1,14 ± 0,26	0,42 ± 0,03	0,32 ± 0,00	0,20 ± 0,07
Ácido decanoico	2,88 ± 0,43	0,44 ± 0,13	0,28 ± 0,07	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,12 ± 0,00

Producción de enzimas: prueba						
Proteasa: caseína	+	-	-	+	+	-
Proteasa: gelatina	-	-	-	-	-	+
Pectinasa: pectinasa	+	-	-	+++	+	-
Glucanasa: $\beta$ -glucanasa	-	++	-	+++	+++	++
Glucanasa: lichenasa	++	+	-	+	-	-
$\beta$ -glucosidasa: arbutina	-	+	+	++	+++++	+++++
Celulasa: YPD+CMC	-	-	++	+	-	+
Celulasa: YPGE+CMC	+	-	-	+	-	+
Xilanasa: hemi-celulasa	-	+	-	+	+	-
Xilanasa: celobiosa	-	-	+	-	-	-
Almidón: $\alpha$ -amilasa	-	-	-	-	-	-
Sulfito reductasa: GJIA	+	+	+	+	+	+

- Ausencia de actividad; +(n) Presencia de actividad (intensidad)

Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar de fermentaciones realizadas por triplicado

Los parámetros generales del mosto Malvar de partida empleado en las fermentaciones con las levaduras no-*Saccharomyces* nombradas en la tabla superior, fueron: 1.094 g L<sup>-1</sup> de densidad; pH 3,30; y acidez total 6,86 (expresada como g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico).

## II.2. Medios de cultivo

### *Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (YPD)*

Medio completo para el crecimiento de levaduras compuesto de 20 g L<sup>-1</sup> de glucosa, 20 g L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica y 10 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura. Para conseguir medio sólido se añadieron 20 g L<sup>-1</sup> de agar. Estos productos fueron obtenidos de Laboratorios Conda S.A. (Madrid, España).

### *Agar lisina*

El medio lisina es un medio selectivo que soporta el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces*, sin embargo, las levaduras del género *Saccharomyces* son incapaces de utilizar la lisina como única fuente de nitrógeno por lo que no crecen en este medio de cultivo. El medio lisina está compuesto por 11,75 g L<sup>-1</sup> de Yeast Carbon Base (Difco, EE.UU.), 2,5 g L<sup>-1</sup> de L-Lisina monoclóhidrato (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 20 g L<sup>-1</sup> de agar.

### ***Mosto de uva de la variedad Malvar***

El mosto Malvar empleado durante las elaboraciones en esta tesis proviene de las cosechas de 2010, 2014 y 2015 donde el proceso de vendimia y procesado del mosto fue prácticamente el mismo. Las uvas se vendimiaron en un estado de maduración adecuado para la elaboración de los vinos y en buenas condiciones sanitarias. La vendimia se realizó de manera manual en cajas con una capacidad de 50 L, que pueden albergar aproximadamente 22-25 Kg de uva para el transporte y fueron llevadas hasta la bodega experimental del IMIDRA, donde se introdujeron en una cámara frigorífica a 10°C para bajar su temperatura antes del procesado. Posteriormente, las cajas de vendimia fueron pesadas en una báscula y descargadas de manera manual. Así, las uvas de la variedad Malvar se estrujaron y despalillaron en una despalilladora estrujadora ME modelo DP-80. La uva estrujada y despalillada se prensó en tres ciclos hasta 0,75 bares en una prensa neumática SKRLJ modelo PSP 9, con un rendimiento del mosto del 60% aproximadamente. El mosto obtenido fue sulfitado a razón de 5 g hl<sup>-1</sup> y se llevó a depósitos de acero inoxidable de 500 L, que se mantuvieron a 4°C durante 20 horas para realizar el desfangado. A continuación, se midieron diferentes parámetros químicos en los mostos como se explica en el apartado II.3, que fueron ajustados según las necesidades de fermentación. En genral, se partió de un grado Brix en torno a 21.0, una acidez titulable entre 5-6 g L<sup>-1</sup> y un NFA de 250 mgN L<sup>-1</sup>.

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo por tratamiento térmico en autoclave a 121°C durante 20 minutos. En el caso del mosto Malvar, se realizó una pasteurización a vapor fluyente en autoclave a 80°C durante 15 minutos. Este proceso se realizó tres veces en tres días consecutivos, para así evitar la caramelización de los azúcares del mosto.

### **II.3. Análisis químico de mostos y vinos**

#### ***Grado Brix (°Brix) y Grado alcohólico probable (GAP)***

El grado Brix del mosto Malvar se midió previa fermentación por refractometría. La medida se realizó con un refractómetro digital modelo PR-100 de Atago® (Tokio, Japón) con sensor de temperatura a 20°C, previo ajuste del cero con agua destilada. El GAP se determinó a partir del grado Brix mediante la tabla de equivalencia provista por el fabricante.

### ***Acidez total titulable y pH***

Ambas medidas fueron realizadas en los mostos Malvar en un titrador automático Crison modelo Compact Titrator (Crison Instruments, Barcelona). Se realizó una valoración potenciométrica con una disolución de NaOH 0,5M, los valores de acidez titulable obtenidos se expresaron en g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico.

### ***Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)***

Los valores de NFA en los mostos Malvar fueron determinados siguiendo el método de Sørensen o de la titulación con formol (Sørensen, 1907) con modificaciones del laboratorio de Enología del IMIDRA.

Para proceder a la determinación del NFA, se centrifugó previamente el mosto a 10.000 rpm, y posteriormente se llevó a 20°C en un baño termostático. Seguidamente se tomaron 50 mL de mosto y se llevó a pH 8 con una solución de NaOH 1N, realizando el ajuste en un valorador automático (Compact Titrator de Crison). A continuación, el mosto se diluyó a la mitad con agua milli-Q y se ajustó de nuevo a pH 8 con NaOH 0,1N o HCl diluido, según fue necesario. Se tomó una alícuota de 50 mL y se añadieron 20 mL de formaldehído 40% (Panreac), previamente ajustado a pH 8, y se dejó en agitación durante 15 minutos. Por último, se procedió de nuevo a valoración con NaOH 0,1N en el valorador automático. El NFA se determinó en función al volumen de NaOH 0,1N gastado (mL) según la ecuación:  $NFA (mg L^{-1}) = mL \text{ de NaOH gastados} \times 56$

### ***SO<sub>2</sub> libre y SO<sub>2</sub> total***

Los valores de SO<sub>2</sub> libre y SO<sub>2</sub> total se analizaron inicialmente en los mostos y finalmente en los vinos antes del embotellado. El análisis se llevó a cabo mediante el método de Ripper sencillo (Ripper, 1898) realizado en un valorador automático (Compact Titrator de Crison). La valoración se realizó con adición de yodo en medio ácido y un electrodo de doble hilo de platino como indicador (Crison Instruments).

Finalmente, los análisis de los parámetros generales de los vinos a final de fermentación fueron analizados por Liec Agroalimentaria S.L. (Manzanares, Ciudad Real), laboratorio acreditado para el análisis fisicoquímico en vinos conforme a las normas UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. En todas las muestras se realizaron análisis de grado alcohólico, acidez total, acidez volátil, pH, azúcares reductores, glucosa, fructosa, glicerol, sulfuroso

libre, sulfuroso total, ácido tartárico, ácido L-málico, ácido L-láctico, ácido D-glucónico, CO<sub>2</sub> y masa volúmica mediante FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) que aunque no está incluido como método de referencia en el libro internacional de métodos de análisis de mosto y vino de la OIV, esta organización ha publicado un apéndice con directrices para el uso de los analizadores infrarrojos en enología (Resolución OIV/OENO 390/2010).

## II.4. Monitorización y control de la fermentación

### *Análisis de densidad del mosto-vino*

La medida de la densidad del mosto-vino es comúnmente empleada en bodegas para llevar un control sobre el proceso de fermentación, puesto que el descenso de la densidad es directamente proporcional a la bajada en el nivel de azúcares durante la fermentación. Esta medida se llevó a cabo en el ensayo a escala piloto en bodega de los cultivos puros, mixtos y secuenciales con *S. cerevisiae* y cepas de no-*Saccharomyces*; para ello se empleó un densímetro manual modelo Densito 30P (a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) de Mettler Toledo (Figura II.4.1).



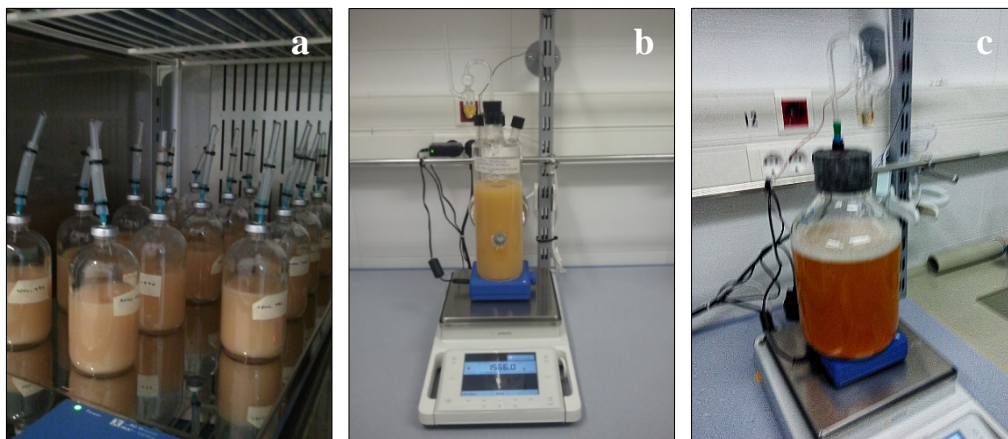
**Figura II.4.1.** Medida de la densidad en los vinos elaborados a escala piloto.

### *Control de pérdida de peso del mosto-vino*

El estudio de la pérdida de peso por el desprendimiento de CO<sub>2</sub> durante la fermentación es usado como un método útil y rápido para el control del proceso. La pérdida de CO<sub>2</sub>, es proporcional a la disminución del contenido en azúcares del mosto durante la fermentación. Para el control de la evolución de las fermentaciones de 100 mL (Figura II.4.2a) se empleó una balanza modelo BP610 de Sartorius (Goettingen, Alemania); para las fermentaciones de 1 L o 5 L (Figuras II.4.2b, 2c), la pérdida de peso se obtuvo de manera



automática con una balanza Cubis® de Sartorius, controlada mediante el software OPCEX3 (Resolvica Inc., Chanhassen, MN, EE.UU.). Estas fermentaciones se llevaron a 18°C en una sala termostatzada y en agitación constante a 150 rpm con un agitador magnético.



**Figura II.4.2.** Fermentaciones en diferentes volúmenes de mosto Malvar realizadas durante esta tesis. a) Fermentaciones en 100 mL de mosto en fermentadores taponados herméticamente y con sistema de salida del CO<sub>2</sub>, que consta de una goma de silicona, una aguja de 25 mm, una campana Durham de 40 mm y dos bridas para unir las diferentes partes. b) Fermentaciones en 1 L de mosto provistos de una válvula Müller con ácido sulfúrico al 96% para permitir la liberación de CO<sub>2</sub> y una sonda de temperatura. c) Fermentaciones en 5 L de mosto en botellas pírax de 5 L con una válvula Müller y sonda de temperatura.

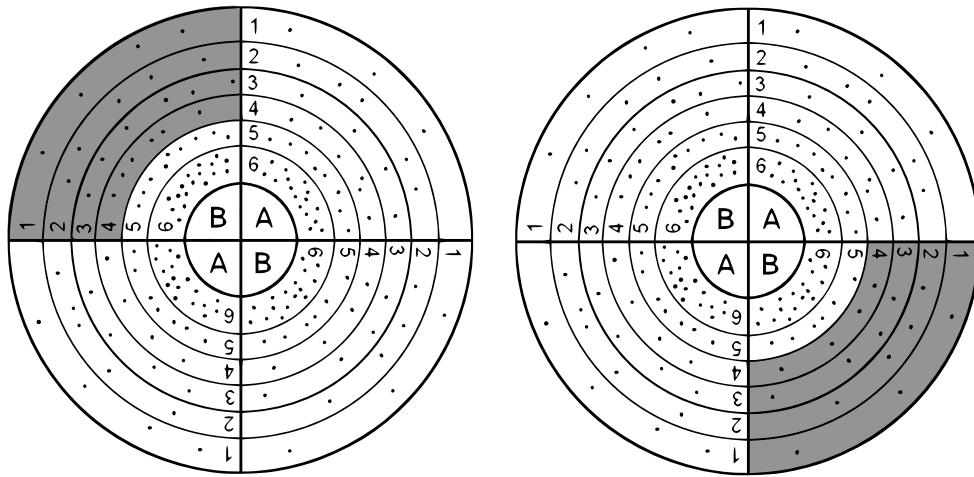
La evolución de la cinética fermentativa de las diferentes escalas realizadas (100 mL, 1L y 5L), se llevó a cabo mediante la representación gráfica de la pérdida de peso o disminución de densidad frente a días de duración de la fermentación.

### II.5. Recuento de poblaciones de levaduras mediante diluciones sucesivas y siembra en placa

Se prepararon diluciones seriadas de las muestras tomadas en diferentes momentos de la fermentación y se sembraron 50 µL en medio sólido en placa, utilizando un sembrador de colonias automático easySpiral® (Interscience, St. Nom, Francia) en el modo de siembra exponencial. Para el conteo de colonias, se siguió el manual de sembrador según el modo de conteo manual.

*Conteo manual*

Se sitúa la placa Petri sobre la plantilla de conteo, con la forma que se muestra a continuación:



www.interscience.com

Para efectuar el conteo se siguen las siguientes indicaciones:

- Elegir un cuarto A o B (1/4 del disco).
- Comenzar a contar desde el sector 1 (exterior) en el cuarto de disco elegido.
- Se cuentan las colonias de los sectores del cuarto elegido, empezando desde el borde de la placa Petri hacia el centro, hasta contabilizar un total de 20 colonias. Una vez se han contado las 20 colonias se debe de completar el recuento del resto de las colonias del sector correspondiente.

Si llegado el sector 6 hay menos de 20 colonias (para placas Petri de 90 mm), se debe de realizar el conteo total de las colonias de la placa.

- A continuación, se cuentan las colonias del mismo número de sectores que los contados en el cuarto opuesto.
- Por último, se suman las colonias contadas en cada uno de los cuartos.

### ► Interpretación del conteo microbiano según el método estándar NF V08-100

N es superior a 15 colonias en la placa completa y menor de 216 colonias en ambos sectores 1 opuestos	N es mayor de 216 colonias en ambos sectores 1 opuestos	N es menor de 15 colonias en la placa completa	N = 0 (no hay colonias en la placa)
$n = (N \cdot 1000) / (V \times D)$	$n > (216 \cdot 1000) / (V \times D)$	El intervalo de confianza obtenido del conteo es amplio.	
		n estimado = $(N \cdot 1000) / (V_t \times D)$	$n < (1 \cdot 1000) / (V_t \times D)$

### ► Interpretación del conteo microbiano según el método estándar ISO 4833-2

N es mayor de 20 colonias en la placa completa y menor de 150 colonias en ambos sectores 1 opuestos	N es mayor de 150 colonias en ambos sectores 1 opuestos	N es menor de 20 colonias en la placa completa
$n = (N \cdot 1000) / (V \times D)$	$n > (150 \cdot 1000) / (V \times D)$	El intervalo de confianza obtenido del conteo es amplio. La placa no es válida.

n: concentración microbiana en UFC/mL

N: Número de colonias contadas

D: Índice de dilución de la muestra

V: Volumen depositado en el área de conteo en  $\mu\text{L}$  (Apéndice. Volúmenes constantes)

V<sub>t</sub>: Volumen depositado en la placa completa en  $\mu\text{L}$ .

#### *Apéndice. Volúmenes constantes*

Volúmenes constantes en el modo exponencial por pares de sectores opuestos usando la plantilla de conteo easySpiral®

Los volúmenes encontrados en la tabla inferior son volúmenes acumulativos. Por ejemplo, cuando se indica el volumen del sector 4, corresponde a la suma de los volúmenes de los sectores 1, 2, 3 y 4.

Pares de sectores opuestos	Placa Petri 90mm Modo exp./50 µL µL plaqueados (vol. cum.)	Placa Petri 150mm Modo exp./50 µL µL plaqueados (vol. cum.)
1	1,00	0,040
2	2,58	0,110
3	5,07	0,230
4	9,00	0,450
5	15,21	0,820
6	25,00	1,479
7	-	2,620
8	-	4,630
9	-	8,130
10	-	14,270
11	-	25,000
Placa Petri	50,00	50,000

## II.6. Extracción de ADN de las levaduras

Para la extracción de ADN empleado en el análisis de la evolución de las poblaciones de levaduras en los cultivos puros, mixtos y secuenciales a escala piloto en bodega por qPCR se empleó el kit DNeasy minikit Plant de Qiagen, mientras que para la extracción de ADN previa a la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* por microsatélites y para el análisis de PCR-RFLP de las regiones ITS del ADNr 5.8S fue utilizado el kit ArchivePure DNA Purification, comercializado por 5PRIME. Ambos protocolos se detallan a continuación.

### *DNeasy minikit Plant de extracción de ADN (Qiagen, EE.UU.)*

- A partir de 1 mL de muestra de vino, tomada diariamente de los cultivos ensayados a escala piloto (subapartado 3.4), se centrifugó y retiró el sobrenadante. Se añadió 1 mL de agua destilada estéril, y el pellet fue resuspendido con una pipeta. La muestra fue centrifugada, de nuevo, a 14.000 rpm durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante.

- Se resuspendieron las células en 700 µL de **tampón API\*** y se pasó la muestra a un Eppendorf de 2 mL estéril con 1 g de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. A continuación, se lisaron las células en un molino mezclador (Retsch GmbH, Haan, Germany) a la máxima velocidad 3 veces durante 1 minuto, con intervalos de 1 minuto en hielo. Después, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm, 1 minuto.

- El sobrenadante fue transferido a un Eppendorf de 1,5 mL y mezclado con 4 µL de **RNasa A\***. La mezcla fue incubada a 65°C durante 10 minutos.

- Se añadieron 130 µL de **tampón AP2\*** y se mezcló bien. Después, se mantuvo durante 5 minutos en hielo y tras este tiempo, se centrifugó a 14.000 rpm durante 4 minutos a 4°C.
- El lisado de células se pasó a una columna **QIAshredder Mini Spin Column\*** y centrifugó a 14.000 rpm durante 2 minutos.
- El ADN fue colectado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y lavado con 675 µL de **tampón AP3/E\***.
- Un volumen de 650 µL de la mezcla fue transferido a una columna **DNeasy Mini Spin Column\*** y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto. Este mismo proceso fue repetido con el resto de mezcla sobrante.
- Se conservó la columna y lavó con 500 µL del tampón AW\*, dos veces. Después, se centrifugaban a 14.000 rpm durante 2 minutos.
- Finalmente, el ADN fue eluído en un nuevo Eppendorf estéril con 100 µL de **tampón AE\***.

\* Todos los reactivos en negrita son los originales procedentes del kit comercial.

### *ArchivePure DNA Purification kit de extracción de ADN (5PRIME, Germany)*

#### *Lisis celular*

- Un volumen de 1 mL de cultivo de levaduras (incubado durante toda la noche y conteniendo aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  células) era añadido a un Eppendorf de 1,5 mL. La mezcla fue mantenida en hielo.
- La muestra se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 minuto, para así eliminar el sobrenadante.
- Se añadió 300 µL de **Cell Suspension Solution\*** y el pellet fue resuspendido con una pipeta.
- Se añadieron 1,5 µL de **Lytic Enzyme Solution\***, y se mezcló bien invirtiendo el tubo 25 veces.
- La muestra era incubada a 37°C durante 30 minutos para digerir las células. Durante la incubación, el tubo debía ser invertido.

- Se centrifugó a 14.000 rpm durante un minuto para eliminar el sobrenadante.
- Se añadieron 300 µL de **Cell Lysis Solution**<sup>\*</sup> a la muestra.

#### *Precipitación de proteínas*

- Se añadió 100 µL de **Protein Precipitation Solution**<sup>\*</sup> al lisado de células.
- El lisado era agitado con un vortex a la máxima velocidad durante 20 segundos.
- Y se centrifugó a 14.000 rpm durante 3 minutos. Se debería formar un pellet blanco consistente, si no era así, repetir el paso anterior seguido de una incubación en hielo durante 5 minutos y luego volver a centrifugar (14.000 rpm, 3 minutos).

#### *Precipitación de ADN*

- El sobrenadante con el ADN era recogido en un Eppendorf de 1,5 mL que contenía 300 µL de Isopropanol al 100%.
- Se mezclaba bien por inversión durante 50 veces.
- Y tras centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto, el ADN debía observarse como un pequeño pellet blanco.
- Se eliminó el sobrenadante y se secó el tubo con papel absorbente. Después, 300 µL de Etanol al 70% fueron añadidos; el tubo se invirtió varias veces para lavar el pellet de ADN.
- Tras centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto, se tiró el etanol con mucho cuidado.
- El tubo era secado con papel absorbente, y después secado en el Speed-Vac (Thermo Electron Corporation) entre 5 y 10 minutos.

#### *Hidratación de ADN y Tratamiento con RNasa*

- Para hidratar el ADN, se añadieron 50 µL de **DNA Hydration Solution**<sup>\*</sup>.
- Además, se añadió 1,5 µL de **RNase A Solution**<sup>\*</sup> para purificar la muestra.
- Se mezcló con vortex durante 1 minuto y se dio un spin para recoger todo el líquido. La mezcla era incubada a 37°C durante 1 hora.

- Para que el ADN se continuara hidratando, fue incubado una hora más a 65°C o dejado toda la noche a temperatura ambiente.

- Las muestras se guardaron a 4°C. Para largos periodos de conservación, se congelaron a -20°C o -80°C.

\* Todos los reactivos en negrita son los originales procedentes del kit comercial.

### II.7. Identificación y cuantificación de levaduras

#### *PCR-RFLP de las regiones ITS del ADNr 5.8S*

El análisis 5.8S-ITS-RFLP se empleó para la identificación de las especies de levaduras de la colección CLI. Todas las especies de la colección del IMIDRA utilizadas en el estudio fueron confirmadas mediante nueva identificación aplicando esta misma técnica. El análisis consistió en la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS4 del ADN ribosómico con los cebadores ITS1 e ITS4, la digestión con las enzimas de restricción (*HaeIII*, *CfoI* e *HinfI*) y el análisis del tamaño de los productos de PCR y los fragmentos de restricción de acuerdo con Esteve-Zarzoso et al. (1999).

La amplificación de la región ITS del ADNr se llevó a cabo añadiendo 1,5 µL del ADN en estudio junto con 18,5 µL de una mezcla de reacción de PCR, cuya composición se recoge en el siguiente cuadro:

Compuesto	Concentración del stock	µL en 20 µL de reacción
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,4
dNTPs	10 mM	0,4
Buffer	5X	4
Cebadores ITS1 e ITS4	10 µM	0,4
ADN polimerasa	2 U/µL	0,5
Agua milli-Q estéril	Pura	12,4
ADN	20-80 ng/µL	1,5

La enzima ADN polimerasa utilizada fue suministrada por Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, EE.UU). Los cebadores utilizados fueron: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') suministrados por Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, EE.UU.). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 98°C durante 30



segundos; 35 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 10 segundos, alineamiento a 55°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 30 segundos; una etapa de extensión final a 72°C durante 7 minutos. Las PCRs fueron realizadas con un termociclador Primus 96 (PEQLAB, Erlangen, Alemania).

La digestión del producto de PCR fue realizada con las endonucleasas de restricción *Hae*III, *Cfo*I e *Hin*fI (Roche Diagnostics, Barcelona, España) a 37°C durante una noche. La mezcla de reacción contiene:

Compuesto	μL de reacción
Enzima ( <i>Hae</i> III, <i>Cfo</i> I e <i>Hin</i> fI)	0,5
Buffer	1
Agua milli-Q estéril	3,5
Producto de PCR	5

Finalmente, la visualización de los fragmentos de reacción se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa (Agarosa D2, Conda, Madrid, España) a una concentración de 1,4% en el caso de PCR-ITS y a 2,5% en el caso de los RFLP, diluída en TBE 1X (Tris-Borate-EDTA) (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania). Se empleó el fluoróforo Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Alemania) para la visualización de los fragmentos de ADN. En ambos análisis para determinar el tamaño de los fragmentos de amplificación, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.).

### ***Secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S del ADNr***

El análisis de secuenciación de los dominios D1/D2 del ADNr 26S fue utilizado para la identificación de las especies de levaduras y el posterior diseño de cebadores específicos. Para ello, en primer lugar, se realizó una amplificación con los primers NL1 (5'-CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman y Robnett, 1998) junto al resto de componentes propios de la técnica de PCR, como se describe a continuación:

Compuesto	Concentración stock	μL en 20 μL de reacción
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,4
dNTPs	10 mM	0,4
Buffer	5X	4
Cebadores NL1 y NL4	10 μM	0,4
ADN polimerasa	2 U/μL	0,5
Agua milli-Q estéril	Pura	12,4
ADN	20-80 ng/μL	1,5

En cada tubo se añadieron 18,5 μL de la mix de reacción y 1,5 μL de ADN, obteniendo un volumen final de 20 μL. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, anillamiento a 52°C durante 1 minuto y una extensión a 72°C durante 2 minutos; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. El producto de PCR fue cargado en un gel de agarosa al 1% (Agarosa D2, Conda, Madrid, España) para verificar que había amplificación.

A continuación, el producto de reacción se envió a Macrogen (Amsterdam) donde fue purificado y secuenciado con un secuenciador capilar ABI 3730XL. Finalmente, Macrogen mandó un informe con la secuencia de los dominios D1/D2 del gen ADNr 26S de cada cepa enviada y el resultado de un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) que mostraba la identidad de la cepa secuenciada tras un alineamiento de secuencia en la base de datos del NCBI (National Centre for Biotechnology Information), considerando un umbral de identidad correcta los porcentajes por encima del 98%.

### ***Diseño de cebadores***

Los oligonucleótidos cebadores empleados en la PCR cuantitativa en tiempo real fueron diseñados para las secuencias de los dominios D1/D2 del ADNr 26S de las cepas de levaduras ensayadas. En primer lugar, dichas secuencias, correspondientes a la doble cadena de ADN generada con los cebadores “forward” (NL-1) y “reverse” (NL-4) enviadas por Macrogen, fueron limpiadas y corregidas; para ello a partir de la secuencia generada con el primer NL-4, se generó su cadena reversa y complementaria a través de la página web, <http://insilico.ehu.es/translate/>. A continuación, se hizo un alineamiento de ambas secuencias en formato FASTA a través del programa ClustalW2

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), para así eliminar las partes de las secuencias no coincidentes (Figura II.7.1., en rojo) y corregir aquellas bases que tengan algún error (Figura II.7.2., en verde).

Tras la revisión de las secuencias, se empleó el programa Primer3Plus para el diseño de cebadores (<http://www.primer3plus.com>), donde fue introducida la secuencia de la cadena positiva y fue seleccionado, en configuración avanzada, que la longitud óptima del amplificado generado por los cebadores diseñados fuera de 150 pb, desde un tamaño mínimo de 100 pb hasta un máximo de 200 pb. El programa generó 5 parejas de cebadores idóneos para el fragmento de secuencia de los dominios D1/D2, con las condiciones fijadas.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  -----ACAAGCATGCCTCAGTACGGCG
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  CCTTTATTATTCAAATAACGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGA
                                *      *      *

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  AGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCGGGAATTGTAATTGAAGAGATTGG
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  GTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCGGGAATTGTAATTGAAGAGATTGG
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  GTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGT
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  GTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGT
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  GAACCCCTTCAAAGCCTTCATCCCAGATCTCCAAGATCGAGTTGTTGGGAATGCAGCT
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  GAACCCCTTCAAAGCCTTCATCCCAGATCTCCAAGATCGAGTTGTTGGGAATGCAGCT
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  CTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACA
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  CTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACA
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  GTACAGTGATGGAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTG
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  GTACAGTGATGGAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTG
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  TTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACTTAAGTGGGCCAGCATCGGGCGGCGGGGAG
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  TTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACTTAAGTGGGCCAGCATCGGGCGGCGGGGAG
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  CAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTCGAGGATTATAACCCCGGCCCTTACTCCCTCACC
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  CAAAACCACCGGGGAATGTACCTTTCGAGGATTATAACCCCGGCCCTTACTCCCTCACC
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  ACCCGGAGGCTGCAATCTAAGGATGCTGCGTAAATGGTTGCAAGTCGCCGCTCTTAAAA
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  ACCCGGAGGCTGCAATCTAAGGATGCTGCGTAAATGGTTGCAAGTCGCCGCTCTTAAAA
                                *****

140916-12_D20_CLI457_NL1.ab1  CCCCCGAACAAAAGGAA
140916-12_E20_CLI457_NL4.ab1  -----

```

**Figura II.7.1.** Solapamiento con el programa Clustal W2 de las secuencias generadas con los cebadores NL-1 y NL-4 en la cepa *M. pulcherrima* CLI 457.

Posteriormente, previamente a su selección, diferentes aspectos de los cebadores diseñados, fueron estudiados con la herramienta para análisis de cebadores del NIST (<http://yellow.nist.gov:8444/dnaAnalysis/primerToolsPage.do>) (National Institute of

Standards and Technology). Se analizan sus características, así como, las interacciones entre las secuencias de los propios cebadores y la formación de horquillas.

Una última comprobación antes de la selección de los cebadores fue comparar sus secuencias con aquellas encontradas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este paso se realizó para confirmar que la secuencia de los cebadores coincide con secuencias de la misma especie incluidas en la base de datos y que no coincide con las secuencias de otras especies típicamente encontradas en el vino.

Teniendo toda esta información sobre los cebadores diseñados, se seleccionaron los mejores para la amplificación de los dominios D1/D2 del gen 26S ADNr para cada cepa de levadura estudiada, sabiendo previamente que un buen primer debe cumplir las siguientes condiciones:

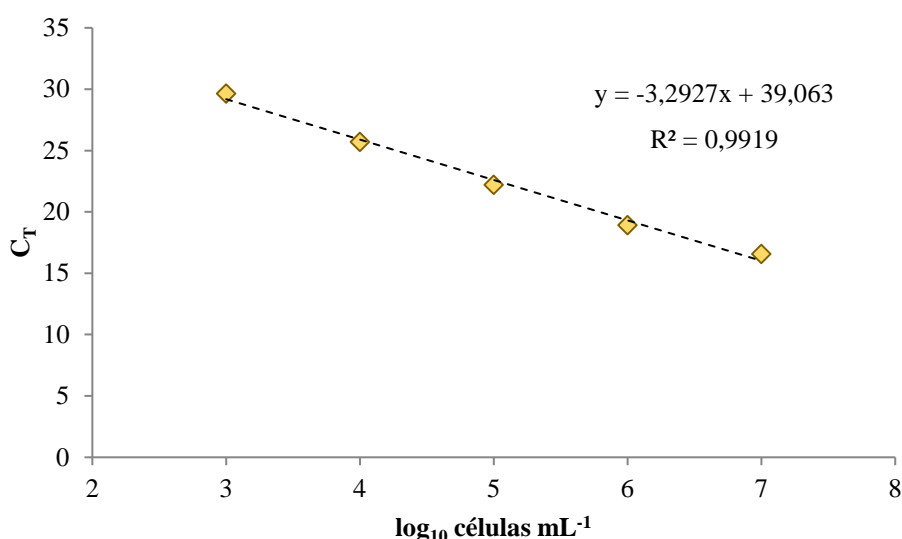
- Temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) entre 55°C y 80°C.
- Proporción de G-C comprendida entre el 50% y 60%.
- Ausencia de complementariedad entre las secuencias de los cebadores.
- Optimización de la concentración en un rango inferior a 1  $\mu$ M.

Finalmente, los cebadores diseñados para cada cepa en estudio fueron sintetizados por TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania).

Previamente al análisis de las poblaciones de levaduras en las muestras de vino por qPCR, los cebadores fueron utilizados en amplificaciones por PCR convencional usando diferentes especies de levaduras incluidas en la colección del IMIDRA para así asegurar la especificidad de cada pareja de primer por la especie para la cual habían sido diseñados. Además de las cepas las especies en estudio (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *S. pombe*, *C. stellata* y *L. thermotolerans*), se ensayaron cepas de especies como *Candida vini*, *Priceomyces carsonii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailli*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Lachancea fermentati*; estas especies fueron mayoritarias en la fermentación espontánea de mostos Malvar en la bodega experimental del IMIDRA (Cordero-Bueso et al., 2013).

**PCR cuantitativa (qPCR)**

La PCR cuantitativa en tiempo real fue utilizada para la cuantificación de las levaduras a lo largo del proceso de fermentación, previa construcción de rectas patrón para cada cepa de levadura estudiada. Las rectas patrón fueron construidas con los valores de  $C_T$  y diluciones seriadas de concentración de células conocida ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). El valor de  $C_T$  obtenido de las muestras de fermentación era interpolado en la recta patrón de la cepa correspondiente (Figura II.7.2), para así conocer la concentración de células de cada cepa en un momento determinado del proceso de fermentación alcohólica. El equipo empleado para el análisis de qPCR fue un termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.) acoplado a un ordenador donde se recoge la fluorescencia generada en tiempo real por las reacciones de amplificación del ADN.



**Figura II.7.2.** Recta patrón obtenida para *M. pulcherrima* CLI 457. Los valores de  $C_T$  para cada punto son la media de tres repeticiones individuales.

La amplificación de PCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems) en los que se dispensan 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que contiene 12,5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania), 0,75  $\mu\text{L}$  de cada primer correspondiente a una concentración de 7  $\mu\text{M}$  (ambas secuencias “forward” y “reverse”) (Tabla II.7.1.), 5  $\mu\text{L}$  de ADN y 6  $\mu\text{L}$  de agua milli-Q estéril. Las condiciones de reacción constan de las siguientes etapas: un paso inicial a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos.

**Tabla II.7.1.** Cebadores específicos utilizados en ensayos de qPCR en este trabajo.

Especie de levadura	Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC1	GAAAACTCCACAGTGTGTTG	Zott et al. (2010)
	SC2	GCTTAAGTGC GCGGTCTTG	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Tods L2	CAAAGTCATCCAAGCCAGC	Zott et al. (2010)
	Tods R2	TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SP1-F	AGTGAAGCGGGAAAAGCTCA	Este trabajo
	SP1-R	ATCGACCAAAGACGGGGTTC	
<i>Candida stellata</i>	CS1-F	AGTAACGGCGAGTGAACAGG	Este trabajo
	CS1-R	GGCTATCACCTCTATGGCG	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	MP2-F	AGACACTTAACTGGGCCAGC	Este trabajo
	MP2-R	GGGGTGGTGTGGAAGTAAGG	
<i>Lachancea thermotolerans</i>	LTH2-F	CGCTCCTTGTGGGTGGGGAT	Este trabajo
	LTH2-R	CTGGGCTATAACGCTTCTCC	

## II.8. Técnicas de caracterización de levaduras

### *Tecnología de fenotipo microarrays (PM)*

La tecnología fenotipo microarrays, disponible comercialmente a través de Biolog Inc (Hayward, CA, EE.UU.), está basada en la medida de la actividad metabólica de los microorganismos por incubación y lectura colorimétrica de las microplacas en la unidad Omnilog (Biolog). El principio de este ensayo es la reducción del cloruro de tetrazolio, indicador redox usado comúnmente en experimentos bioquímicos para indicar especialmente la respiración celular. El colorante reducido de color morado se mide por espectrofotometría a 590 nm. La señal producida por la acumulación del colorante en el pocillo de la microplaca durante el periodo de incubación es integrada y representada como la intensidad de señal redox frente al tiempo y es proporcional al número de células vivas en el pocillo (Greetham, 2014).

En el ensayo se estudió la tolerancia de aislados de levaduras frente a diferentes situaciones de estrés generadas por tres variables: presión osmótica, etanol y pH. El medio de cultivo base para el ensayo de PM fue preparado usando: 6 g L<sup>-1</sup> de glucosa (p/v), 0,67 g L<sup>-1</sup> de YNB (yeast nitrogen base) (p/v), 0,2 µL de colorante D (Biolog) y suplementado con una mezcla de nutrientes (NS) (NS × 48; 24 mM de adenina-HCl, 4,8 mM de L-

histidina-HCl monohidrato, 48 mM de L-leucina, 24 mM de L-lisina-HCl, 12 mM de L-metionina, 12 mM de L-triptófano y 14,4 mM de uracilo).

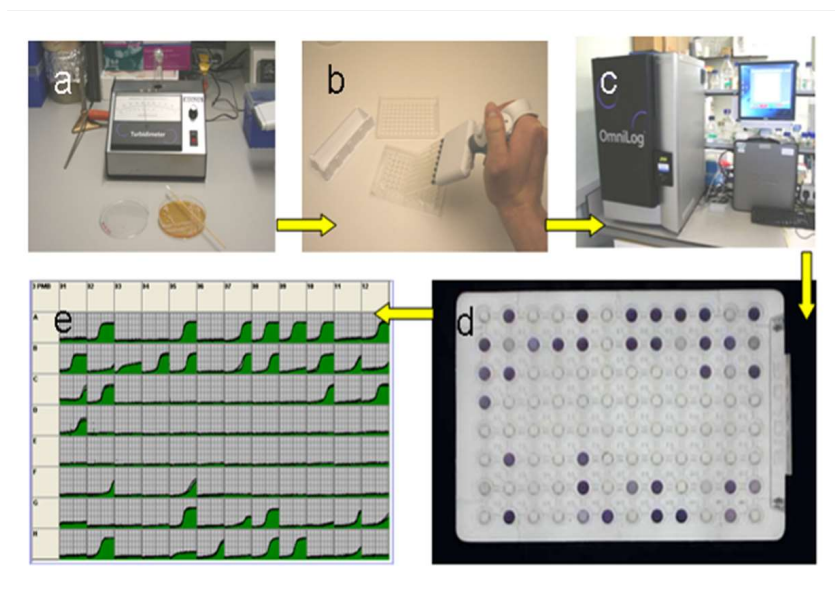
El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo base junto a cada uno de las disoluciones de los agentes de estrés estudiados, a la concentración y condiciones fijadas. Para el estudio de estrés por presión osmótica se ensayaron dos concentraciones de sorbitol al 20% y 30% a partir de una solución stock de sorbitol al 80%; el sorbitol es una fuente de carbono no fermentable por las levaduras por lo que se usa como agente estresante para observar el efecto de la presión osmótica en estos microorganismos (Hirasawa et al., 2006). Para el ensayo de resistencia a etanol se estudiaron tres concentraciones diferentes. El medio de cultivo base se ajustó con etanol al 96% para obtener concentraciones finales del 5%, 8%, 13% y 18% de alcohol respectivamente. Para generar los diferentes pH estudiados, pH 3,0 y pH 3,4, se ajustó el pH del medio base con ácido fosfórico esterilizado por filtración.

La suspensión de células para la inoculación se preparó mezclando 125  $\mu\text{L}$  de un cultivo de levaduras de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (62% de transmitancia), con 2,65 mL de buffer IFY (Biolog), ajustando a un volumen final de 3 mL con agua milli-Q estéril. Luego 90  $\mu\text{L}$  de esta mezcla fueron inoculados en cada pocillo de la placa de 96 pocillos de Biolog. El volumen final en cada pocillo fue de 120  $\mu\text{L}$ , correspondientes al medio de cultivo con cada uno de los agentes de estrés a la concentración requerida y la suspensión celular.

Para crear condiciones anaerobias, las placas se introdujeron en bolsas absorbentes de oxígeno (Mitsubishi AnaeroPak™System) con un indicador de anaerobiosis (Oxoid, Reino Unido), se sometieron a vacío, se sellaron y se incubaron a 30°C durante 96 horas sin agitación en la cámara de incubación del equipo OmniLog. El lector automático de placas OmniLog fotografió las placas a intervalos de 15 minutos, convirtiendo la densidad de pixeles en cada pocillo en una señal que refleja el crecimiento celular y la conversión del colorante. Después de esas 96 horas, los datos de señal son exportados desde el programa Biolog a una hoja Excel de Microsoft® para su análisis. Los ensayos se realizaron por triplicado y se consideró la media de los tres valores. El porcentaje de intensidad de la señal redox fue calculado usando la intensidad de los valores de señal redox a las 25 horas (fase exponencial de crecimiento) en cada situación de estrés ensayada en comparación con



el crecimiento de la cepa de levadura cultivada en condiciones no estresantes en el mismo intervalo de tiempo (Figura II.8.1).



**Figura II.8.1.** Análisis mediante fenotipo microarray en cepas de levaduras vínicas. a) se prepara la suspensión de células (62% de transmitancia) y se mezcla con una solución apropiada que contiene el colorante indicador redox; b) se transfiere a la placa de 96 pocillos que contiene las soluciones de las diferentes condiciones de estrés estudiadas, más un tratamiento control en cada caso; c) la placa se introduce en la unidad de lectura OmniLog donde los resultados de cambio de color en la placa se van grabando automáticamente; d) los datos guardados tras 96 horas de incubación son analizados para determinar la habilidad de las cepas de levadura de crecer bajo las diferentes condiciones estresantes estudiadas.

### ***PCR-SSR (secuencias simples repetidas) o de microsatélites***

Para la diferenciación de cepas de la especie de levaduras *S. cerevisiae* se ha empleado la técnica PCR mediante marcadores tipo SSR (secuencias simples repetidas, microsatélites) con alto grado de polimorfismo (Field y Wills, 1998; González Techera et al., 2001; Pérez et al., 2001; Vaudano y García-Moruno, 2008). En nuestro caso, se han usado los loci SCPTSY7, SC8132X y YOR267C para los cuales se utilizaron los cebadores indicados en la Tabla II.8.1, todos ellos sintetizados por MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemania).

**Tabla.II.8.1.** Relación de cebadores empleados en la técnica PCR-SSR.

Loci	Cromosoma	Secuencia	Referencias
SC8132X	XVI	F: CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTTGG R: CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC	Field y Mills (1998)
YOR267C	XV	F: GGTGACTCTAACGGCAGAGTGG R: GGATCTACTTGCAGTATACGGG	Field y Mills (1998) González-Techera et al. (2001)
SCPTSY7	XIII	F: AAAAGCGTAAGCAATGGTGTAGAT R: AAATGATGCCAATATTGAAAAGGT	Pérez et al. (2001) Vaudano y García-Moruno (2008)

La mezcla de reacción para la PCR múltiple fue la siguiente:

Compuesto	Concentración stock	μL en 20 μL de reacción
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,24
dNTPs	10 mM	0,8
Buffer	5X	4
Cebador SCPTSY7	10 μM	4
Cebador SC8132X	10 μM	1,5
Cebador SCYOR267C	10 μM	1
ADN polimerasa	2 U/μL	1
ADN	25-100 ng/μL	1,5

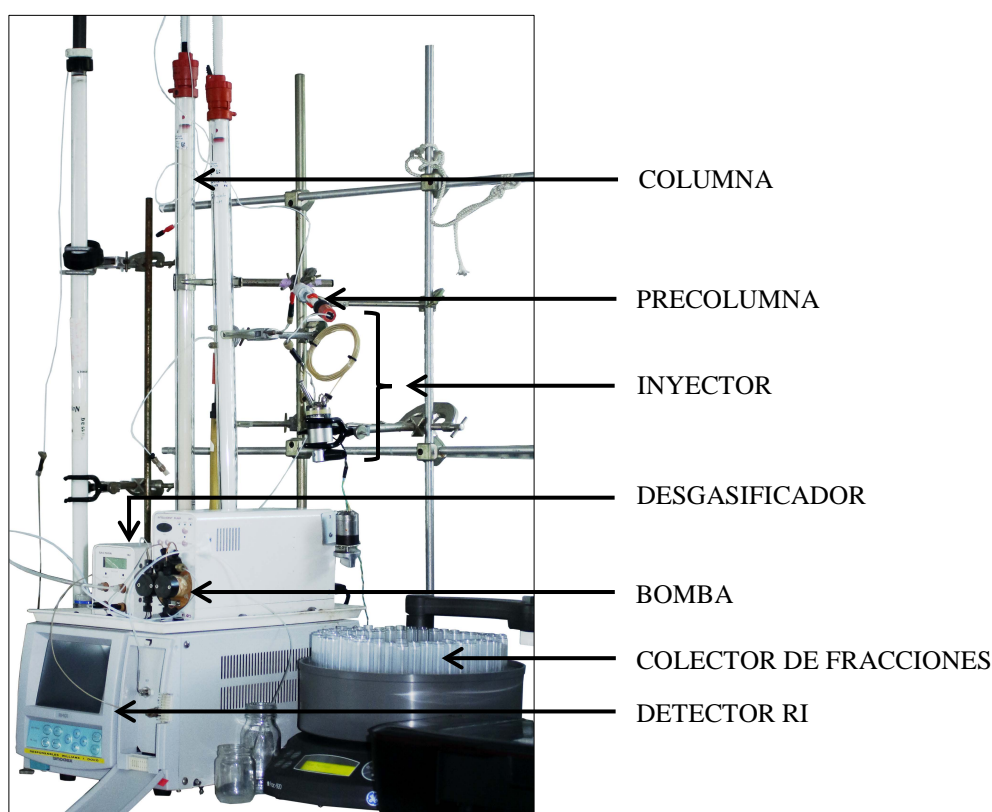
Las condiciones de PCR fueron: un precalentamiento inicial a 94°C durante 4 minutos; 28 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 45 segundos y 72°C durante 30 segundos; y un ciclo final a 72°C durante 10 minutos (Vaudano y García-Moruno, 2008). Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa 2,5% con Midori Green como intercalante de ADN (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Alemania), en TBE 1X (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania) a 100 voltios durante 90 minutos. El tamaño de los fragmentos de ADN fue determinado por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.).

## II.9. Análisis del contenido y estructura de polisacáridos y oligosacáridos en vino

### *Decoloración de las muestras*

Antes de analizar la composición de los carbohidratos complejos en los vinos Malvar elaborados con *T. delbrueckii* CLI 918 y *S. cerevisiae* CLI 889, fue necesario eliminar al máximo la materia colorante del vino, incluso trabajando con vino blanco, ya que ésta podría interferir en el análisis. Para ello se preparó una pequeña columna con una

punta de pipeta Gilson de 5 mL de volumen, cuyo extremo fue taponado con algodón, y se rellenó la columna con un gel de poliamida CC6 (tamaño de partícula 0,05-0,16 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) hidratado con cloruro de sodio 1M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) hasta un volumen aproximado de 4,8 mL de gel. Posteriormente, se añadieron 5 mL de la muestra de vino blanco y, tras elución por gravimetría a través de la columna, los compuestos no retenidos fueron recogidos en un recipiente de vidrio, lavándose inmediatamente la columna con 8 mL de NaCl y que fueron asimismo recogidos en el mismo recipiente. Las muestras fueron concentradas seguidamente en un evaporador centrífugo (EZ-2, Genevac, Ipswich, Reino Unido) hasta un volumen inferior a 2 mL.



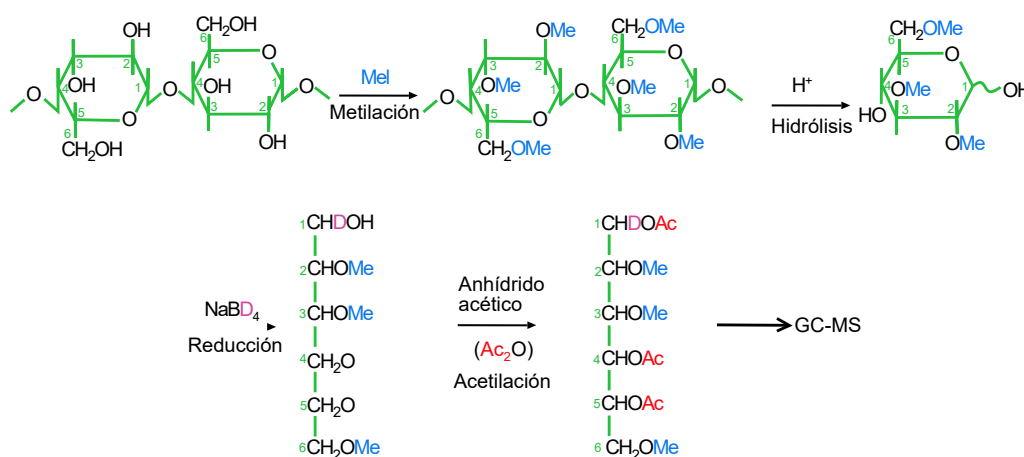
**Figura II.9.1.** Componentes del equipo empleado para la separación de las fracciones de polisacáridos y oligosacáridos de los vinos por HRSEC.

### *Separación de las fracciones de polisacáridos y oligosacáridos en el vino*

Las fracciones de polisacáridos y oligosacáridos de las muestras de vino fueron separadas por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HRSEC). Para ello se utilizó un equipo compuesto por un inyector con una válvula Rheodyne® y un bucle de 2 mL, una bomba para cromatografía líquida Intelligent 301 (FLOM, Francia) acoplada a un desgasificador, y un colector de fracciones Frac-920 (GE Healthcare Bio-Sciences,

Pittsburgh, PA, EE.UU.) (Figura II.9.1). La elución de la muestra se realizó en una columna Superdex 30-HR (60 × 1,6 cm, Pharmacia, Estocolmo, Suecia) precedida por una precolumna (0,6 × 4 cm), empleándose como eluyente formiato de amonio 30mM (Acros Organics, Geel, Bélgica) a pH 5.6 y con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La elución de los polisacáridos y oligosacáridos fue monitorizada con un detector de índice de refracción RI 101 (Shodex Showa Denko, Japón) controlado con el software Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, EE.UU.).

El proceso de elución tenía una duración de 120 minutos. La fracción de polisacáridos fue eluída entre los minutos 41 y 55, mientras que la fracción de oligosacáridos lo fue entre los minutos 56 y 93. Ambas fracciones fueron recuperadas de forma independiente, a razón de 1 mL por minuto, lo que equivalía a recuperar 1 mL por tubo. El contenido de los tubos correspondientes a la fracción de polisacáridos se juntó en un mismo recipiente y fue liofilizado. Después se re-disolvió en agua milli-Q y se liofilizó cuatro veces más para así eliminar las sales de amonio presentes en el eluyente utilizado durante la separación a través de la columna. El contenido de los tubos correspondientes a la fracción de oligosacáridos siguió idéntico procedimiento.



**Figura II.9.2.** Reacciones que suceden en la fracción de polisacáridos del vino para el análisis de su estructura y composición.

*Análisis de la estructura y composición de los polisacáridos del vino*

La fracción de polisacáridos de los vinos de la variedad Malvar fue metilada, hidrolizada y analizada mediante GC-EI-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas con ionización por impacto de electrones) para su estudio con el método de los acetatos de alditol parcialmente metilados, determinándose así la composición de los enlaces glicosil en los polisacáridos del vino. En la Figura II.9.2. se esquematizan las reacciones que se dan en los polisacáridos durante este análisis.

En un vial de vidrio, se agitó un total de 1 mg de polisacáridos de cada muestra de vino en 0,5 mL de DMSO. La mezcla fue colocada en un termobloque a 120°C durante 2 minutos para facilitar su óptima dilución y, una vez enfriada, fue metilada por la adición carbanión metilsulfinilo y yoduro de metilo (Hakomori, 1964). Las muestras metiladas fueron posteriormente hidrolizadas con 0,5 mL de ácido trifluoroacético 2N (Merck, Darmstadt, Alemania) a 120°C durante 75 minutos en un termobloque. Una vez liberados los monosacáridos metilados se convirtieron en sus correspondientes acetatos de alditol tras el tratamiento con 0,5 mL de borodeuterio de sodio ( $\text{NaBD}_4$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y posterior acetilación con 0,5 mL de acetato de etilo, 1,5 mL de anhídrido acético y 0,05 mL de ácido perclórico al 70%, todos ellos de Merck (Darmstadt, Alemania) (Harris et al., 1984). Finalmente, el análisis de sus acetatos de alditol parcialmente metilados se completó mediante GC-EI-MS usando una columna capilar DB-1 (30 m  $\times$  0,25 mm de diámetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película). El cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010SE (Shimadzu, Kioto, Japón) fue programado para este análisis a una temperatura de mantenimiento de 135°C durante 10 minutos y un incremento posterior de 1,2°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 180°C, empleándose hidrógeno como gas conductor. El mioinositol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) fue utilizado como patrón interno y se añadió a cada muestra, verificándose de este modo el rango de metilación.

*Estudio de características moleculares de los polisacáridos del vino*

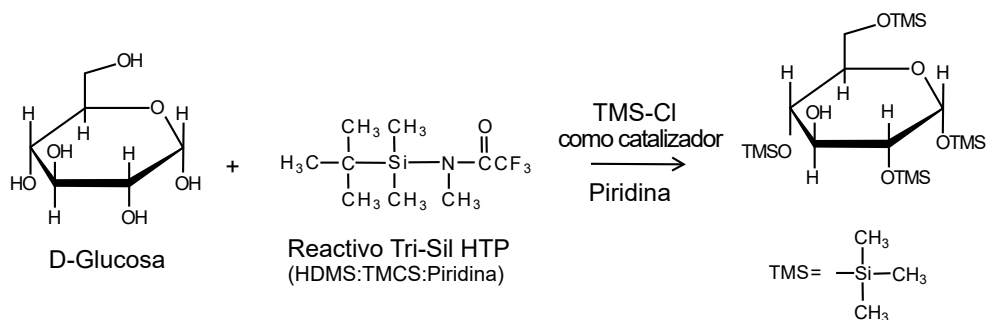
Una muestra de 200  $\mu\text{L}$  tomada a partir de la fracción liofilizada de los polisacáridos del vino, previamente hidratada con 1 mL de agua milli-Q, fue centrifugada a 15.000 rpm durante 15 minutos. Un volumen de 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fue transferido a un vial de vidrio para determinar: i) peso molecular ( $M_w$ ,  $\text{g mol}^{-1}$ ); ii) masa molar media ( $M_n$ ,  $\text{g mol}^{-1}$ ); iii) índice de polidispersidad ( $M_w/M_n$ ); estos tres parámetros fueron analizados con el equipo SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser

multiángulo) y un detector de RI; iv) y la viscosidad intrínseca ( $\eta$ , mL g<sup>-1</sup>) con un viscosímetro diferencial. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizó en una precolumna OH-pack seguida de dos columnas en serie Shodex OH-pack KB-804 y KB-805 (0,8 × 30 cm; Shodex Showa Denko, Japan) a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> en nitrato de litio 0,1 M (LiNO<sub>3</sub>). El fotómetro MALLS era un DAWN-HELEOS de Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, EE.UU.) y estaba equipado con un láser de arseniuro de galio (Ga-As) ( $\lambda$ = 658 nm). El detector del viscosímetro diferencial constaba de un diseño del puente con cuatro tubos capilares. La concentración de cada polisacárido eluido fue determinada usando un detector de índice de refracción (Optilab TrEx, Wyatt Technology Inc., EE.UU.). Todos los datos recogidos fueron analizados con el programa Astra V 6.0.6. con la técnica “zimm plot” (orden 1) para la estimación de la masa molar y el incremento del índice de refracción del polímero en el solvente usado. Se empleó un valor clásico de  $dn/dc$  para los polisacáridos (0,146 mg L<sup>-1</sup>) (Redgwell et al., 2005).

### *Análisis de los oligosacáridos del vino*

Tras efectuarse la cuarta liofilización sobre la fracción de oligosacáridos del vino, la muestra fue hidratada con 1 mL de agua milli-Q. Se transfirió un volumen de 750  $\mu$ L de muestra a un tubo de ensayo junto con 1 mL de agua milli-Q y 50  $\mu$ L de mioinositol (Sigma Aldrich), empleándose este último como patrón interno; esta mezcla se liofilizó por quinta vez. Una vez seca la muestra, tuvo lugar una solvólisis a 80°C durante 16 horas por adición de 450  $\mu$ L de una solución formada con 140  $\mu$ L cloruro de acetilo (Merck) junto 1 mL de metanol anhidro (Sigma Aldrich) que, a su vez, contenía ácido clorhídrico 0,5M. Posteriormente, se produjo en la muestra una reacción de sililación debido a la adición del reactivo Tri-Sil HTP (0,3 mL) (HMDS:TMDS: Piridina; Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) (Figura II.9.3) donde los metil glucósidos formados en la reacción anterior se transforman en derivados trimetilsilil metil glucósidos, los cuales fueron analizados a continuación mediante GC. Los derivados TMS fueron separados con dos columnas capilares DB-1 (30 m × 0,25 mm de diámetro interno, 0,25  $\mu$ m de espesor de película) acopladas al extremo del inyector a través de una férula con dos huecos, y fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Shimadzu GCMS-QP2010SE, empleándose hidrógeno como gas conductor. La programación de temperatura en el equipo fue: 120-145°C a 1,5°C min<sup>-1</sup>, 145-180°C a 0,9°C min<sup>-1</sup> y 180-230°C a 50°C min<sup>-1</sup>. La salida de una de las columnas estaba directamente conectada a un FID a 250°C, y la segunda columna

estaba conectada al detector de masas. Las muestras fueron inyectadas en modo split, con una relación de split 20:1. El espectro de masas de la ionización de electrones fue obtenido desde  $m/z$  50 a 400 cada 0,2 segundos en modo de monitorización de iones totales, mediante el uso de una temperatura de fuente de iones de 200°C, una corriente del filamento de emisión de 60  $\mu\text{A}$ , y un voltaje de ionización de 70 eV.



**Figura II.9.3.** Reacciones de derivatización de la D-glucosa.

## II.10. Análisis de compuestos aromáticos por cromatografía de gases (GC)

### *Extracción de los compuestos volátiles mayoritarios*

El método de extracción y análisis de los compuestos volátiles mayoritarios usado en el vino fue el descrito por Ortega et al. (2001). Para la extracción, en un tubo de vidrio cónico se añadieron 3,9 g de sulfato amónico (Panreac AppliChem), 6,3 mL de agua milli-Q, 2,7 mL de muestra de vino, 20  $\mu\text{L}$  de una disolución de los patrones internos (detallados más adelante) y 250  $\mu\text{L}$  de diclorometano (DCM) (Panreac AppliChem), empleado como disolvente orgánico. Los tubos fueron cerrados herméticamente para evitar pérdidas de la muestra con un tapón de rosca con septum de silicona. Las muestras fueron agitadas durante 90 minutos a 250 rpm en un agitador de vaivén GFL 3018 (EQUINLAB SAC, Alemania) y luego centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos. Con una pipeta pasteur de vidrio, se extrajo la fase orgánica y se pasó a un Eppendorf de 1,5 mL dónde se centrifugó (14.000 rpm, 15 minutos) para retirar cualquier resto de precipitado que ensucie la muestra e interfiera en el análisis. Se recogieron, al menos, 100  $\mu\text{L}$  de fase orgánica con una jeringa de cromatografía y se pasaron a un inserto de vidrio colocado en un vial de 1,5 mL cerrado con un tapón de rosca con septum de silicona.



***Identificación de los compuestos volátiles por GC-FID***

El análisis de los compuestos volátiles mayoritarios se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID).

Los 32 compuestos volátiles analizados en las muestras de vino se identificaron y cuantificaron usando rectas de calibrado ( $R^2 > 0,98$ ) (Tabla II.10.1) elaboradas con 6 niveles de concentración. Las diferentes diluciones de cada compuesto analizado se realizaron con patrones analíticos diluidos en etanol al 12%; la dilución correspondiente a cada uno de los niveles de la recta se extrajo y analizó por triplicado. Tanto en los patrones como en las muestras, durante el proceso de extracción se añadió una solución con cuatro compuestos que actuaron como patrones internos, 2-octanol (Sigma-Aldrich), 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona (Sigma-Aldrich), 4-metil-2-pentanol (Merck) y 2-butanol (Sigma-Aldrich) que no son encontrados de manera natural en el vino y, fueron seleccionados y agrupados para cada conjunto de compuestos en función de su comportamiento durante la extracción (Ortega et al., 2001).

El equipo empleado fue un GC Agilent 6850 y las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Horno	Temperatura inicial (°C)	40
	Tiempo (min)	5
	Rampa de temperatura (°C min <sup>-1</sup> )	3
	Temperatura final °C	200
	Tiempo (min)	16,57
Columna	Tipo	DB-Wax
	Características	60 × 0,32 × 0,5
	Tasa de flujo (mL min <sup>-1</sup> )	2
	Gas vector	Helio
Inyector	Modo	Splitless
	Temperatura (°C)	250
	Presión (kPa)	15,68
	Flujo de split (mL min <sup>-1</sup> )	60
	Tiempo de splitless (min)	0,75

**Tabla II.10.1.** Ecuaciones de las calibraciones para cada compuesto volátil mayoritario y su  $R^2$  para su análisis por GC-FID.

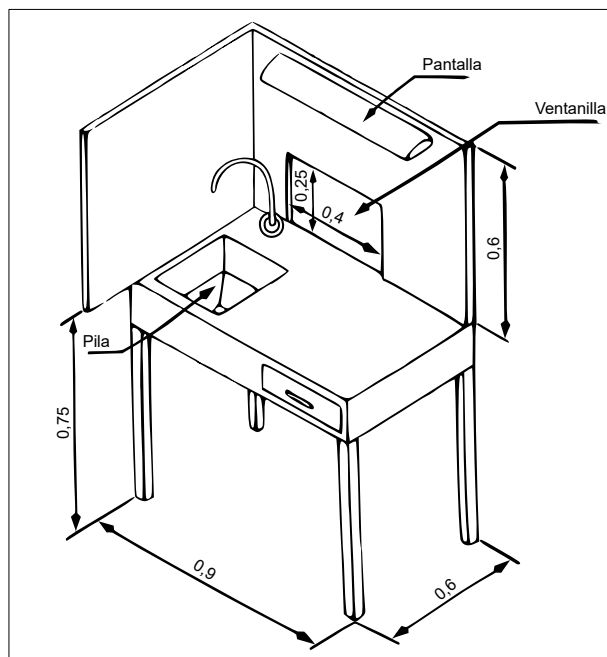
Compuesto	Recta de calibrado	$R^2$
Isobutirato de etilo	$y=0,1691x+0,0549$	0,9806
Diacetilo	$y=0,3745x-0,0021$	0,9901
Butirato de etilo	$y=0,418x-0,0208$	0,9979
Isovalerato de etilo	$y=3,7667x+0,0079$	0,9977
1-Propanol	$y=0,0038x-0,0044$	0,9964
Isobutanol	$y=0,8902x+0,1795$	0,9985
Acetato de isoamilo	$y=0,5346x-0,0281$	0,9985
1-Butanol	$y=0,9017x+0,094$	0,9978
Alcohol isoamílico	$y=1,7119x+4,6555$	0,9961
Hexanoato de etilo	$y=0,4663x-0,007$	0,9943
Acetato de hexilo	$y=0,8264x-0,0291$	0,995
Acetoína	$y=0,1474x+0,1326$	0,9965
Lactato de etilo	$y=0,3798x-0,0272$	0,9978
1-Hexanol	$y=0,7023x-0,0224$	0,999
cis-3-Hexenol	$y=0,756x-0,0139$	0,9976
Octanoato de etilo	$y=0,4966x-0,0142$	0,9967
Furfural	$y=0,5266x+0,0026$	0,9928
3-Hidroxi-butirato de etilo	$y=1,2973x+0,0018$	0,9987
Benzaldehído	$y=0,867x-0,0006$	0,9968
Ácido isobutírico	$y=0,312x-0,0083$	0,9943
Ácido butírico	$y=4,1768x-0,3768$	0,9901
$\delta$ -Butirolactona	$y=0,3573x+0,0528$	0,9991
Fenilacetaldehído	$y=0,3331x+0,0003$	0,9947
Ácido isovalerianico	$y=0,876x-0,0093$	0,9945
Succinato de dietilo	$y=0,3247x+0,0115$	0,9989
Metionol	$y=0,1728x+0,0047$	0,9897
Acetato de 2-etilfenilo	$y=0,5076x-0,0003$	0,9972
Ácido hexanoico	$y=0,4444x-0,0016$	0,9974
Alcohol bencílico	$y=1,4512x-0,003$	0,9972
$\beta$ -Feniletanol	$y=0,5532x-0,4167$	0,9977
Ácido octanoico	$y=0,485x+0,0134$	0,9984
Ácido decanoico	$y=0,8347x+0,0224$	0,9979

## II.11. Análisis sensorial de vinos

### *Sala de cata*

La cata de los vinos se realizó en la sala de cata del IMIDRA provista de 12 puestos y que cumple la normativa UNE-EN ISO 8589:2010 (Análisis sensorial. Guía general para el diseño de una sala de cata), donde se detalla que las principales características que debe reunir una sala de cata son:

- i) Disposición de dos zonas separadas, un espacio de preparación de muestras y una zona de realización de las catas. Ambas zonas deben ser separables físicamente por completo para evitar la interferencia de aromas, ruidos u otras molestias que produciría la zona de preparación sobre los jueces que trabajan en la zona de análisis sensorial.
- ii) Los colores de acabado de la sala sean relajantes, lisos y claros. Se recomienda que la luz empleada en la sala sea uniforme, regulable y con luz difusa.
- iii) Es necesario que se garanticen unos niveles de aislamiento térmico y acústico.
- iv) La temperatura debe ser regulable entre 20 y 22°C. La humedad de la sala debe mantenerse entre el 60 y el 70%.
- v) Las cabinas deben tener unas dimensiones estándar y estar equipadas con una lámpara de luz natural diurna, una escupidera/lavabo y un estante en la parte posterior, que facilite la distribución de los vinos que se deberán catar (Figura II.11.1). Puede disponer de equipo informático para procesar los resultados de forma automática. El equipo informático puede sustituirse por una ficha de cata y un bolígrafo.
- vi) Los materiales de fabricación de las cabinas son importantes, ya que deben cumplir con una serie de propiedades: Fácil limpieza, conservación y no desprender olores durante su fase de uso.



**Figura II.11.1.** Esquema y dimensiones recomendadas por la norma ISO 8589 para los puestos de cata.

### ***Panel de cata***

El panel de cata estaba integrado por 7 catadores (cuatro mujeres y tres hombres) del IMIDRA, algunos de los cuales son expertos catadores que forman parte del comité de cata del Consejo Regulador de los “Vinos de Madrid”. Este panel ha sido previamente entrenado en el laboratorio para el reconocimiento de aromas y parámetros de calidad del vino, usando primero estándares y posteriormente con muestras de vino reales (Lozano et al., 2007). Para la cata, 50 mL de vino blanco de las diferentes elaboraciones fueron servidos a una temperatura en torno a 12°C en copas que cumplían con la normativa ISO 3591:1977.

### ***Pruebas triangulares***

El objetivo de estas pruebas era determinar si existe una diferencia sensorial entre los dos vinos presentados. En esta prueba se presentaron a los jueces tres muestras de vino simultáneamente, identificadas mediante códigos aleatorios de tres dígitos. Se informó a los jueces de que dos de las muestras son iguales. La tarea del panel de cata era identificar cual es la muestra diferente de las otras dos, para ello se evaluaron las muestras en el orden en el que se proporcionaron de izquierda a derecha. Además de señalar cuál es la muestra

diferente, los jueces podían añadir comentarios en un apartado de observaciones incluido en la ficha de cata (ver en el apartado Fichas de cata).

En esta prueba había seis órdenes de agrupación posible; considerando que las muestras A y B son diferentes, las posibles combinaciones serían: AAB, BBA, ABA, BAB, ABB y BAA. La interpretación de las respuestas se llevó a cabo mediante tablas de rangos (ver en el apartado Tablas de significación) (Roessler et al. 1948), con un nivel de significación del 5%.

### ***Pruebas descriptivas***

El objetivo de estas pruebas era identificar las diferencias entre los vinos presentados a través de determinados descriptores en los cuales se cuantificó la intensidad de un atributo determinado en el vino. En esta prueba se pidió a los catadores que evaluaran los vinos en tres fases: visual, olfativa y gustativa (ver en el apartado Fichas de cata). Se pidió a los catadores que evaluaran las características organolépticas del vino mediante una escala de 0 a 10, dónde 0 corresponde a “Nulo” ya que esa característica estaba ausente en el vino valorado y 10 como “Muy fuerte” que corresponde a la máxima intensidad del descriptor. Además, se pidió a los catadores que mostraran su orden de preferencia entre las muestras presentadas y también podían añadir comentarios sobre los vinos valorados. Los resultados se representaron en gráficos elaborados a partir de las medias aritméticas de las puntuaciones de todos los jueces.

*Fichas de cata*

**PRUEBA TRIANGULAR**

Nombre del catador:

Fecha:

Se presentan dos grupos de tres muestras cada uno, en cada grupo dos muestras son iguales entre sí.

Indique cuál es la muestra diferente:

Grupo A	667	290	110
Grupo B	414	810	992

Comentarios sobre las diferencias percibidas:

Grupo A

Grupo B

**PRUEBA DESCRIPTIVA****CATA DE VINOS BLANCOS JÓVENES**

Nombre:

Fecha:

Muestra:

	Nulo	Muy débil		Débil		Moderado			Fuerte		Muy Fuerte
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>FASE VISUAL</b>											
Intensidad de color											
<b>FASE AROMÁTICA</b>											
Intensidad aromática global											
Aroma frutal											
Aroma vegetal/herbáceo											
Aroma alcohólico											
Aroma de oxidación											
Aroma microbiológico											
Carácter alcohólico											
Calidad global del aroma											
<b>FASE GUSTATIVA</b>											
Dulce											
Ácido											
Salado											
Amargo											
Astringencia											
Carácter alcohólico											
Cuerpo											
Persistencia											
Calidad global del gusto/armonía											

Orden de preferencia de las muestras presentadas

1-

2-

3-

4-

5-

6-



*Tablas de significación*

Niveles de significación de la prueba triangular (Roessler et al. 1948)

Nº Resp.	Nº mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de			Nº Resp.	Nº mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de			Nº Resp.	Nº mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de		
	5% P=0,05	1% P=0,01	0,1% P=0,001		5% P=0,05	1% P=0,01	0,1% P=0,001		5% P=0,05	1% P=0,01	0,1% P=0,001
5	4	5	-	37	18	20	22	69	31	34	36
6	5	6	-	38	19	21	23	70	32	34	37
7	5	6	7	39	19	21	23	71	32	34	37
8	6	7	8	40	20	22	24	72	32	35	38
9	6	7	8	41	20	22	24	73	33	35	38
10	7	8	9	42	21	22	25	74	33	36	39
11	7	8	10	43	21	23	25	75	34	36	39
12	8	9	10	44	21	23	25	76	34	36	39
13	8	9	10	45	22	24	26	77	34	37	40
14	9	10	11	46	22	24	26	78	35	37	40
15	9	10	12	47	23	25	27	79	35	38	41
16	10	11	12	48	23	25	27	80	35	38	41
17	10	11	13	49	23	25	28	81	36	38	41
18	10	12	13	50	24	26	28	82	36	39	42
19	11	12	14	51	24	26	29	83	37	39	42
20	11	13	14	52	25	27	29	84	37	40	43
21	12	13	15	53	25	27	29	85	37	40	43
22	12	14	15	54	25	27	30	86	38	40	44
23	13	14	16	55	26	28	30	87	38	41	44
24	13	14	16	56	26	28	31	88	39	41	44
25	13	15	17	57	27	29	31	89	39	42	45
26	14	15	17	58	27	29	32	90	39	42	45
27	14	16	18	59	27	30	32	91	40	42	46
28	15	16	18	60	28	30	33	92	40	43	46
29	15	17	19	61	28	30	33	93	40	43	46
30	16	17	19	62	28	31	33	94	41	44	47
31	16	18	19	63	29	31	34	95	41	44	47
32	16	18	20	64	29	32	34	96	42	44	48
33	17	19	20	65	30	32	35	97	42	45	48
34	17	19	21	66	30	32	35	98	42	45	49
35	18	19	21	67	30	33	36	99	43	46	49
36	18	20	22	68	31	33	36	100	43	46	49

## NOTAS

<sup>1</sup> Los valores dados en la tabla han sido calculados a partir de la fórmula exacta de la distribución binomial de parámetro  $p=1/3$  con  $n$  respuestas.

<sup>2</sup> Cuando el número de respuestas es superior a 100 ( $n>100$ ) es necesario utilizar la fórmula siguiente:

El número mínimo de respuestas ( $X$ ) es el valor entero más próximo a:  $X = n/3 + 0,5 + z \cdot \sqrt{n}$

donde

$z = 1,960$  para  $\alpha < 0,05$

$z = 2,576$  para  $\alpha < 0,01$

$z = 3,291$  para  $\alpha < 0,001$

## II.12. Bibliografía

Arroyo, T. (2000) *Estudio de la influencia de diferentes tratamientos enológicos en la evolución de la microbiota y en la calidad de los vinos elaborados con la variedad 'Airén', en la D.O. 'Vinos de Madrid'*. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá.

Arroyo, T., Cordero, G., Serrano, A. y Valero, E. (2010) 'β-Glucosidase production by non-*Saccharomyces* yeasts isolated from vineyard', in Blank, I.; Wüst, M.; Yeretian, C. (ed.) *Expression of Multidisciplinary Flavour Science*. Winterthur, Switzerland, pp. 359–362.

Balboa-Lagunero, T. (2012) *Mejora de la calidad aromática de los vinos ecológicos mediante la reducción de aromas de oxidación*. Universidad Autónoma de Madrid.

Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M. y Arroyo, T. (2013) 'Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.)', *European Food Research and Technology*, 236(1), pp. 193–207.

Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Gil-Díaz, M., García, M., Cabellos, J. y Arroyo, T. (2016) 'Improvement of Malvar wine quality by use of locally-selected *Saccharomyces cerevisiae* strains', *Fermentation*, 2(1), pp. 1–7.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999) 'Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), pp. 329–337.

Field, D. y Wills, C. (1998) 'Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(4), pp. 1647–1652.

González Techera, A., Jubany, S., Carrau, F. M. y Gaggero, C. (2001) 'Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers', *Letters in Applied Microbiology*, 33(1), pp. 71–75.

Greetham, D. (2014) 'Phenotype microarray technology and its application in industrial biotechnology', *Biotechnology Letters*, 36(6), pp. 1153–1160.

Hakomori, S. I. A. (1964) 'A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide', *The Journal of Biochemistry*, 55(2), pp. 205–208.

Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B. y Stone, B. A. (1984) 'An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides', *Carbohydrate Research*, 127(1), pp. 59–73.

Hirasawa, T., Ashitani, K., Yoshikawa, K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H. y Shioya, S. (2006) 'Comparison of transcriptional responses to osmotic stresses induced by NaCl and sorbitol additions in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(6), pp. 568–571.

Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. (1998) 'Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences', *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), pp. 331–371.

Lozano, J., Santos, J. P., Arroyo, T., Aznar, M., Cabellos, J. M., Gil, M. y Horrillo, M. del C. (2007) 'Correlating e-nose responses to wine sensorial descriptors and gas chromatography-mass spectrometry profiles using partial least squares regression analysis', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 127(1), pp. 267–276.

Ortega, C., López, R., Cacho, J. y Ferreira, V. (2001) 'Fast analysis of important wine volatile compounds-development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts', *Journal of Chromatography A*, 923(1–2), pp. 205–214.

Pérez, M. A., Gallego, F. J., Martínez, I. y Hidalgo, P. (2001) 'Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers', *Letters in Applied Microbiology*, 33(6), pp. 461–466.

Redgwell, R. J., Schmitt, C., Beaulieu, M. y Curti, D. (2005) 'Hydrocolloids from coffee: Physicochemical and functional properties of an arabinogalactan-protein fraction from green beans', *Food Hydrocolloids*, 19(6), pp. 1005–1015.

Ripper, M. (1898) 'Die schweflige saure im wein und deren bestimmung', *Journal fur Praktische Chemie*, 46, pp. 428–473.

Roessler, E. B., Warren, J. y Guymon, J. F. (1948) 'Significance in triangular taste tests', *Journal of Food Science*, 13(6), pp. 503–505.

Sörensen, S. P. L. (1907) 'Enzymestudien', *Biochemische Zeitschrift*, 7, pp. 45–101.

Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. (2012) 'Genetic diversity in commercial wineries: Effects of the farming system and vinification management on wine yeasts.', *Journal of Applied Microbiology*, 112(2), pp. 302–315.

Vaudano, E. y García-Moruno, E. (2008) 'Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis', *Food Microbiology*, 25(1), pp. 56–64.

Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A. y Masneuf-Pomarede, I. (2010) 'Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR', *Food Microbiology*, 27(5), pp. 559–567.



